



(51) 国際特許分類6 C12N 1/21, 1/20, C12P 13/08, 13/06 // (C12N 1/21, C12R 1:19) (C12P 13/08, 1:19)	A1	(11) 国際公開番号 WO96/06926 (43) 国際公開日 1996年3月7日 (07.03.96)
(21) 国際出願番号 PCT/JP95/01719 (22) 国際出願日 1995年8月30日 (30.08.95) (30) 優先権データ 特願平6/204856 1994年8月30日 (30.08.94) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 味の素株式会社(AJINOMOTO CO., INC.)[JP/JP] 〒104 東京都中央区京橋一丁目15番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 富田房男(TOMITA, Fusao)[JP/JP] 〒063 北海道札幌市西区発寒4条5丁目7の8 Hokkaido, (JP) 横田 篤(YOKOTA, Atsushi)[JP/JP] 〒063 北海道札幌市西区八軒3条西3丁目6の7の24 Hokkaido, (JP) 橋口賢一(HASHIGUCHI, Kenichi)[JP/JP] 石郷岡正子(ISHIGOOKA, Masako)[JP/JP] 倉橋 修(KURAHASHI, Osamu)[JP/JP] 〒210 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社 中央研究所内 Kanagawa, (JP)		(74) 代理人 弁理士 遠山 勉, 外(TOYAMA, Tsutomu et al.) 〒103 東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 ヨコヤマビル6階 Tokyo, (JP) (81) 指定国 CN, JP, US, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書 明細書とは別に、規則13の2に基づいて提出された微生物の寄託に関する表示 国際事務局による受理の日付: 1995年9月18日 (18.09.95)

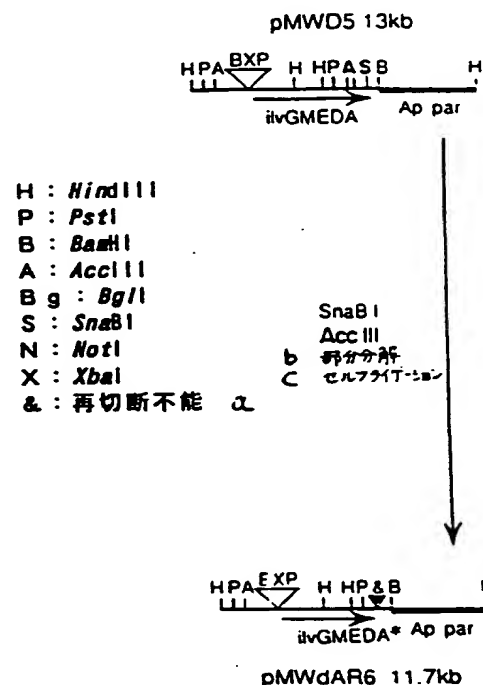
(54) Title : PROCESS FOR PRODUCING L-VALINE AND L-LEUCINE

(54) 発明の名称 L-バリン及びL-ロイシンの製造法

(57) Abstract

L-Valine is produced by culturing in a liquid medium a microorganism demanding lipioic acid for growth, a microorganism deficient in H⁺-ATPase, or a microorganism demanding lipioic acid for growth and deficient in H⁺-ATPase among L-valine- or L-leucine- producing microorganisms of the genus *Escherichia*, accumulating the L-valine produced in the medium, and harvesting the same.

- a: Recleavage impossible
 b: Partial hydrolysis
 c: Self-ligation



(57) 要約

L-バリンまたはL-ロイシン生産能を有するエシェリヒア属に属する微生物において、生育のためにリボ酸を要求する微生物、L-バリンまたはL-ロイシン生産能を有するエシェリヒア属に属する微生物において、 H^+ -ATPaseを欠損した微生物、あるいはL-バリンまたはL-ロイシン生産能を有するエシェリヒア属に属する微生物において、生育のためにリボ酸を要求し、かつ、 H^+ -ATPaseを欠損した微生物を、液体培地に培養し、培養液中にL-バリンを生成蓄積せしめ、これを採取することによって、L-バリンを製造する。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を特定するために使用されるコード

AL	アルバニア	DK	デンマーク	LK	スリランカ	PT	ポルトガル
AM	アルメニア	DE	ドイツ	LR	リベリア	RO	ルーマニア
AT	オーストリア	EE	エストニア	LS	レソト	RU	ロシア連邦
AU	オーストラリア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SD	スーダン
AZ	アゼルバイジャン	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SE	スウェーデン
BB	ベネズエラ	GB	イギリス	LV	ラトヴィア	SG	シンガポール
BG	ブルガリア	GE	グルジア	MC	モナコ	SI	スロベニア
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MD	モルドバ	SK	スロバキア
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	MG	マダガスカル	SN	セネガル
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	MK	マケドニア共和国	SZ	スワジランド
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	ML	マリ	TD	チャド
CA	カナダ	IS	アイスランド	MN	モンゴル	TG	トーゴ
CC	中東アフリカ共和国	IT	イタリア	MR	モリタニア	TJ	タジキスタン
CG	コンゴ	JP	日本	MW	モザンビーク	TM	トルクメニスタン
CH	スイス	KE	ケニア	MX	メキシコ	TR	トルコ
CI	コート・ジボアール	KR	朝鮮民主主義人民共和国	NE	ニジェール	TT	トリニダード・トバゴ
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NL	オランダ	UA	ウクライナ
CO	コロンビア	KZ	カザフスタン	NZ	ニュージーランド	UG	ウガンダ
CZ	チェコ共和国	LI	リヒテンシュタイン	PL	ポーランド	UZ	ウズベキスタン共和国
DE	ドイツ					VN	ベトナム

L-バリン及びL-ロイシンの製造法

技術分野

本発明はL-バリンまたはL-ロイシン生産能を有するエシェリヒア属に属する微生物に関し、詳しくは、L-バリンまたはL-ロイシン生産能が増強された微生物に関する。

背景技術

従来、L-バリン及びL-ロイシンは、主としてプレバクテリウム属、コリネバクテリウム属またはセラチア属に属するL-バリンもしくはL-ロイシン生産菌またはそれらの変異株を用いた発酵法により製造されている（アミノ酸発酵、学会出版センター、397～422頁、1986年）。従来の方法により、これらのアミノ酸の生産性はかなり高まってはいるが、今後のL-バリン及びL-ロイシンの需要の一層の増大に応えるためには、さらに安価かつ効率的な製造法の開発が求められている。

ところで、エシェリヒア (*Escherichia*) 属に属する微生物は、その増殖速度の速さ並びに遺伝子解析の進み方、遺伝子材料の豊富さ等から優れたL-バリン又はL-ロイシン生産菌として利用される可能性を有しているが、エシェリヒア属微生物によるこれらのアミノ酸生産の報告は少なく、L-分岐鎖アミノ酸ではL-イソロイシンの生産例が見られるのみである（特開平5-304969、特開平5-130882）。

発明の開示

本発明は、上記観点から、エシェリヒア属に属する微生物のL-バリン又はL-ロイシン生産能を向上させ、安価かつ効率的なL-バリン及びL-ロイシンの製造法を提供することを課題とする。

本発明者らは、エシェリヒア属に属する微生物の変異株によるL-バリン及びL-ロイシンの生産性について鋭意研究を重ねた結果、生育のためにリボ酸を要

求する変異または／及び H^+ -ATPaseを欠損する変異が、 L -バリン又は L -ロイシン生産菌のこれらのアミノ酸生産能を高めることを見だし、本発明を完成するに至った。

すなわち本願発明の第1の微生物は、 L -バリンまたは L -ロイシン生産能を有するエシェリヒア属に属する微生物において、生育のためにリポ酸を要求することを特徴とする微生物である。本願発明の第2の微生物は、 L -バリンまたは L -ロイシン生産能を有するエシェリヒア属に属する微生物において、 H^+ -ATPaseを欠損したことを特徴とする微生物である。さらに本願発明の第3の微生物は、 L -バリンまたは L -ロイシン生産能を有するエシェリヒア属に属する微生物において、生育のためにリポ酸を要求し、かつ、 H^+ -ATPaseを欠損したことを特徴とする微生物である。

また本願発明は、上記微生物を液体培地に培養し、培養液中に L -バリンまたは L -ロイシンを生成蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする L -バリンまたは L -ロイシンの製造法を提供する。

尚、本明細書において、「 H^+ -ATPase欠損」とは、細胞が H^+ -ATPase活性を実質的に発現しないことをいい、 H^+ -ATPaseの8種類のサブユニットをコードするatpオペロンの全体もしくは一部の欠失、または分断により遺伝子の発現が起こらない場合、及び H^+ -ATPase遺伝子から発現される H^+ -ATPaseタンパクが H^+ -ATPase活性を有しないような1もしくは2以上のヌクレオチドの置換、挿入もしくは欠失を同遺伝子内に有する場合のいずれもが含まれる。また、ilvGMEDAオペロンとは、少なくともilvG、ilvM、ilvE及びilvDの各遺伝子を有するものをいい、活性を持たないスレオニンデアミナーゼを発現するilvA遺伝子を有するもの、あるいは実質的にilvA遺伝子を有しないものも含む。

以下、本発明を詳細に説明する。

< 1 > 本発明の微生物

本発明の微生物は、 L -バリンまたは L -ロイシン生産能を有するエシェリヒア属に属する微生物であり、下記性質の何れかを有する微生物である。

- ①生育のためにリポ酸を要求する。
- ② H^+ -ATPaseを欠損している。
- ③生育のためにリポ酸を要求し、かつ H^+ -ATPaseを欠損している。

本発明においては、上記①～③のいずれの性質を有するものであってもよいが、これらの内では③の性質を有するものが特に好ましい。

このような性質を有する微生物は、自然突然変異もしくは人為突然変異によって、生育のためにリポ酸を要求する変異（以下、「リポ酸要求性変異」という）又は／及び H^+ -ATPaseを欠損する変異（以下、「 H^+ -ATPase欠損変異」という）を付与したエシェリヒア属に属する微生物に、L-バリンもしくはL-ロイシン生産能を付与し、または上記変異株のL-バリンもしくはL-ロイシン生産能を増強することによって得られる。また、本発明の微生物は、L-バリンまたはL-ロイシン生産能を有するエシェリヒア属に属する微生物に、リポ酸要求性変異または／及び H^+ -ATPase欠損変異を導入することによっても得られる。

上記微生物の取得に用いられる微生物としては、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*; 以下、「*E. coli*」ともいう) 等のエシェリヒア属に属する微生物であって病原性のない菌株が挙げられる。具体的な例としては、次のような菌株が挙げられる。

エシェリヒア・コリ K-12 (ATCC 10798)

エシェリヒア・コリ W3110 (ATCC 27325)

エシェリヒア・コリ W1485 (ATCC 12435)

このようなエシェリヒア属に属する微生物に、リポ酸要求性変異または／および H^+ -ATPase欠損変異を導入するには、通常の変異処理法、例えばX線や紫外線の照射あるいはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン（以下、NGと略す）、亜硝酸等の変異剤に接触せしめる等の方法が適用できる。また、エシェリヒア属に属する微生物への変異の導入は、他の遺伝的手法、例えば遺伝子組換え法、形質導入法、細胞融合法等によっても行うことができる。

変異株取得のためのより具体的な手段は、例えば次のようなものである。

リポ酸要求性変異株（以下、「リポ酸要求株」という）は、変異処理した菌体を寒天平板培地で培養し、リポ酸要求性となったコロニーを分離することによって得られる（A. A. Herbert and J. R. Guest: J. Gen. Microbiol., 53, 363-381(1968)）。リポ酸要求株として具体的には *E. coli* W1485lip2(ATCC25645)等が挙げられる。

H^+ -ATPase 欠損変異株（以下、「 H^+ -ATPase 欠損株」という）は、変異処理した菌株の内、コハク酸を唯一の炭素源とする寒天平板培地で生育できず、グルコースを唯一の炭素源とする平板培地上で生育できる変異株を取得し、更にこの中より H^+ -ATPase を欠損している株を取得することによって得られる。 H^+ -ATPase 欠損株として具体的には、*E. coli* AN718(*E. coli* Genetic Stock Center, Yale University, Department of Biology)等が挙げられる。

H^+ -ATPase は8種類のサブユニットが複雑に集合した分子量約50万の膜結合性酵素であり、ATPを加水分解して生じる自由エネルギー変化によって H^+ を膜外に排出するポンプ機能と、細胞内呼吸により生じた膜内外の H^+ の濃度勾配を利用してATPを合成する機能とがある。またこの酵素は、膜内在性で H^+ 輸送活性を持つF0画分と、膜表在性でATPの分解及び合成を触媒するF1画分に分けられ、F0はa, b, cの3種、F1は α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ の5種のサブユニットから構成されている。これらのどのサブユニットが変異した株でも H^+ -ATPase 欠損株として使用することが出来る。また、 H^+ -ATPase 欠損変異は、変異サブユニットを発現するものでもよく、プロモーター部位の変異等によって H^+ -ATPase を構成するサブユニットが発現しなくなったものでもよい。

さらに、 H^+ -ATPase 欠損株では酸化的リン酸化が行われず、エネルギー獲得は基質レベルのリン酸化で行われることから、 H^+ -ATPase 阻害剤、TCAサイクル阻害剤、呼吸鎖阻害剤、脱共役剤等の各種薬剤を培養液に添加することによっても H^+ -ATPase 欠損と同様の効果が得られることが期待される。このような H^+ -ATPase 阻害剤としてはジシクロヘキシルカルボジイミド、トリブチルスズ、オーロベルチン等が、TCAサイクル阻害剤としてはマロン酸、モノヨード酢酸、メチルバイオレット、2, 4-ジニトロフェノール等が、電子伝達系阻害剤としてはテノイルトリフルオロアセトン、2-n-ノニル-4-ヒ

ドロキシキノリン-N-オキシド、アンチマイシン、脱共役剤としてはバリノマイシン、アテプリン、4, 5, 6, 7-テトラフロロ-2-トリフルオロメチルベンゾイミダゾール等が例示される。これらの阻害剤は、単独で使用してもよく、2種以上の混合物として使用してもよい。

前記のようにして得られたリポ酸要求株を親株としてさらに変異処理を行い、 H^+ -ATPaseを欠損した株を選択することによって、あるいは H^+ -ATPase欠損株を親株としてさらに変異処理を行い、リポ酸を要求するようになった株を選択することによって、リポ酸要求性変異及び H^+ -ATPase欠損変異を共に有する変異株（以下、「リポ酸要求- H^+ -ATPase欠損株」という）が得られる。また、リポ酸要求性変異及び H^+ -ATPase欠損変異をともに有する変異株は、これらの変異の一方を有する変異株に、形質導入、形質転換、細胞融合等によって他方の変異を導入することによっても得ることが出来る。

例えば、リポ酸要求株を親株として、その株に H^+ -ATPase欠損変異を形質導入することにより、リポ酸要求- H^+ -ATPase欠損株が得られる。この場合、親株としては上記W14851ip2株が、 H^+ -ATPase欠損変異の供与菌としては上記AN718株が挙げられる。また、 H^+ -ATPase欠損株を親株として、その株にリポ酸要求性変異を形質導入することによっても、リポ酸要求- H^+ -ATPase欠損株が得られる。

上記のようにして得られるリポ酸要求- H^+ -ATPase欠損変異株としては、例えばE. coli AJ12631等が挙げられる。AJ12631株は、1991年7月24日に通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM P-12381として寄託され、1995年8月29日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-5209の受託番号が付与されている。

本発明の微生物は、エシェリヒア属に属する微生物のリポ酸要求性変異株もしくは H^+ -ATPase欠損変異株、またはリポ酸要求- H^+ -ATPase欠損変異株に、L-バリンもしくはL-ロイシン生産能を付与し、または上記変異株のL-バリンもしくはL-ロイシン生産能を増強することにより得られる。また、本発明の微生物は、L-バリンまたはL-ロイシン生産能を有するエシェリヒア属に属する微生物に、リポ酸要求性変異または/及び H^+ -ATPase欠損変異を導入することによっても得られる。さらに、L-バリンまたはL-ロイシン生

産能が低い微生物であっても、リポ酸要求性変異又は／及び $H^+-ATPase$ 欠損変異を導入することによって、 L -バリンまたは L -ロイシン生産能を高めることができる。

〔1〕 L -バリン生産菌

L -バリン生産菌は、エシェリヒア属に属する微生物のリポ酸要求性変異株もしくは $H^+-ATPase$ 欠損変異株、またはリポ酸要求- $H^+-ATPase$ 欠損変異株に、 L -バリン生産能を付与し、または前記各変異株の L -バリン生産能を増強することによって得られる。

L -バリンの生産能の付与または増強は、例えば、制御機構が実質的に解除された L -バリン生合成系遺伝子をエシェリヒア属に属する微生物に導入することによって行われる。また、エシェリヒア属に属する微生物が保持する L -バリン生合成系遺伝子の制御機構が実質的に解除されるような変異を導入してもよい。

エシェリヒア属に属する微生物において、 L -バリンの生合成の最終段階の反応は、 $i1vGMEDA$ オペロンによってコードされる酵素群によって行われる。 $i1vGMEDA$ オペロンは、 $i1vG$ 、 $i1vM$ 、 $i1vE$ 、 $i1vD$ 、 $i1vA$ の各遺伝子を有しており、各々順に、アセトヒドロキシ酸シンターゼのアイソザイムIIの大サブユニット、小サブユニット、トランスアミナーゼ、ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ及びスレオニンデアミナーゼをコードしている。これらの酵素のうち、アセトヒドロキシ酸シンターゼ、トランスアミナーゼ及びジヒドロキシ酸デヒドラターゼは、ピルビン酸から L -バリンへの合成経路、及び2-ケト酪酸から L -イソロイシンへの合成経路を触媒し、スレオニンデアミナーゼは L -イソロイシン生合成系の律速段階である L -スレオニンから2-ケト酪酸への脱アミノ化反応を触媒する。したがって、 L -バリン合成系の反応を効率よく進行させるためには、スレオニンデアミナーゼ活性を発現しないオペロンを用いることが好ましい。このようなスレオニンデアミナーゼ活性を発現しない $i1vGMEDA$ オペロンとしては、スレオニンデアミナーゼ活性を失うような変異が $i1vA$ に導入された、又は $i1vA$ が破壊された $i1vGMEDA$ オペロン、あるいは $i1vA$ が欠失した $i1vGMED$ オペロンが挙げられる。

また、 $i1vGMEDA$ オペロンは、 L -バリン及び／又は L -イソロイシン

及び／又はL-ロイシンによるオペロンの発現調節（アテニュエーション）を受けるので、生成するL-バリンによる発現抑制を解除するために、アテニュエーションに必要な領域が除去又は変異されていることが好ましい。

上記のような、スレオニンデアミナーゼ活性を発現せず、アテニュエーションが解除された i l v G M E D A オペロンは、野生型 i l v G M E D A オペロンを変異処理し、または遺伝子組換え技術を用いて改変することにより得られる。

i l v G M E D A オペロンとしては、エシェリヒア属細菌由来のもの、特に E. coli 由来の i l v G M E D A オペロンが挙げられる。エシェリヒア属細菌としては、特に制限されないが、具体的にはナイトハルトらの著書（Neidhardt, F.C. et.al., Escherichia coli and Salmonella typhimurium, American Society for Microbiology, Washington D.C., 1208, table 1）にあげられるものが利用できる。i l v G M E D A オペロンを含有するDNAの供与菌として野生株を用いた場合、野生型の i l v G M E D A オペロンを含むDNAが取得される。

ただし、野生型 i l v G M E D A オペロンのDNA供与菌として E. coli を用いる場合、K-12野生株は i l v G 遺伝子がフレームシフト変異をもっているために活性のあるアセトヒドロキシ酸シンターゼのアイソザイムII（AHASII）が発現していない（Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 922, 1991）。従って K-12株をDNA供与菌とする場合には、i l v G 遺伝子がコードするアセトヒドロキシ酸シンターゼIIの活性が回復するようにフレームが戻った変異株を調製してから同変異株をDNA供与菌として用いる必要がある。あるいは K-12株由来の株以外の E. coli をDNA供与菌として i l v G 遺伝子のみを単離し、これを K-12株由来の i l v G M E D A オペロンに導入してもよい。すなわち、K-12株をDNA供与菌として i l v M E D A 部分を単離し、K-12株由来の株以外の E. coli をDNA供与菌として i l v G 遺伝子のみを単離し、両者を連結して完全長の i l v G M E D A オペロンとする。なお、アセトヒドロキシ酸シンターゼのアイソザイムII（AHASII）は大小2つのサブユニットにより構成されており、大サブユニットは i l v G 遺伝子にコードされている。小サブユニットは i l v M 遺伝子にコードされている。

アテニュエーションが解除された i l v G M E D A オペロンを取得する方法は以下の通りである。

i l v G M E D Aオペロンの5' 上流域に存在するアテニュエーターの位置および塩基配列はR. P. Lawther らによって報告されている (Nucleic Acids Res. 15, 2137 (1987))。

スレオニンデアミナーゼを発現しないi l v G M E D Aオペロンを出発材料にして、アテニュエーターが除去されたi l v G M E D Aオペロンを調製することにより、スレオニンデアミナーゼを発現せず、且つアテニュエーターが除去されたi l v G M E D Aオペロンが得られる。

配列表の配列番号1として記載した塩基配列は、i l v G M E D Aオペロンの塩基配列のうち、プロモーター、アテニュエーター、及びi l v G遺伝子コード領域を含む配列であり、アテニュエーションに必要な領域を含んでいる。また、i l v G遺伝子によりコードされるアミノ酸配列を配列番号2に示す。966番目から971番目にいたるDNA配列はリーダーペプチド内に存在する2個のロイシン残基の連続部分をコードし、999番目から1007番目にいたるDNA配列はリーダーペプチド内に存在する3個のバリン残基の連続部分をコードし、1008番目から1016番目にいたるDNA配列はリーダーペプチド内に存在する3個のイソロイシン残基の連続部分をコードする。1081番目から1104番目にいたるDNA配列はアテニュエーター内にあるロー非依存型のターミネーター様シュテム／ループを形成する部分をコードする。

細胞内にL-イソロイシン、L-バリン及びL-ロイシンが十分量存在すると、1081番目から1104番目にいたるDNA配列より転写されるRNAによりロー非依存型のターミネーター様シュテム／ループが形成されるためRNAポリメラーゼによる転写が終結してi l v G M E D Aオペロンは発現しない。

細胞内に、例えばL-バリンが不足すると細胞内にL-バリンが結合したtRNAが不足し、リーダーペプチドをコードする領域内に存在するバリン残基の連続部分でリボゾームによる翻訳が停滞する。このため、mRNAが新たな立体構造を形成するようになって、結果として1081番目から1104番目にいたるDNA配列より転写されるRNAにより形成されていたロー非依存型のターミネーター様シュテム／ループが形成されなくなる。このためRNAポリメラーゼによる転写が続行してi l v G M E D Aオペロンは発現する。L-イソロイシン又はL-ロ

イシンが不足した場合も同様にして i l v G M E D A オペロンは発現する。

したがって、L-バリンによるアテニュエーションに必要な領域を除去するためには、配列表の配列番号 1 に開示される配列の 999 番目から 1007 番目にいたる DNA 配列、または 1081 番目から 1104 番目にいたる DNA 配列を除去すれば良い。同様に、後述の L-ロイシン生産菌の作製において、L-ロイシンによるアテニュエーションに必要な領域を除去するためには、配列表の配列番号 1 に開示される配列の 966 番目から 971 番目にいたる DNA 配列、または 1081 番目から 1104 番目にいたる DNA 配列を除去すれば良い。

ところで、アテニュエーションに必要な領域を除去するとは、アテニュエーションが起こらないように変異が導入されていることを意味する。したがって同変異は i l v G M E D A オペロンの 5' 上流域に存在するアテニュエーター全部を除去するものだけに限定されない。要するに、アテニュエーターがロー非依存型のターミネーター様システム／ループを形成できなくなる変異であってもよい。また、L-バリン生産菌の作製においては、リーダーペプチド内にバリン残基の連続部分が含まれないようにする変異であってもよい。また、L-ロイシン生産菌の作製においては、リーダーペプチド内にロイシン残基の連続部分が含まれないようにする変異であってもよい。上記のいずれの場合もアテニュエーションは機能しなくなるからである。

すなわち、アテニュエーションに必要な領域を除去するとは、i l v G M E D A オペロンの 5' 上流域に存在するアテニュエーター全部、一部または近傍部分を除去するものの他に、アテニュエーター内部に新たな DNA 断片を挿入することも含まれる。

(i) 野生型 i l v G M E D A オペロンの取得

i l v G M E D A オペロンを含有する DNA を取得するには、i l v G M 遺伝子、i l v E 遺伝子、i l v D 遺伝子及び i l v A 遺伝子をおのこの取得し、これらを連結する方法が考えられる。ただし、L-バリン生産菌の取得においては、スレオニンデアミナーゼをコードする i l v A 遺伝子はいらないので、i l v G M 遺伝子、i l v E 遺伝子及び i l v D 遺伝子を連結して i l v G M E D を含有

するDNAを取得してもよい。

まず、*E. coli*、例えば*E. coli* K-12株、*E. coli* W3110株、*E. coli* MC1061株（以上の3株は*i l v G*がフレームシフトを起こしている）、*E. coli* MI162株（*thr-10*, *car-94*, λ^- , *relA1*, *ilvG603*, *thi-1*）、*E. coli* B株（以上の2株は正常な*i l v G*を有している）を培養して培養物を得る。上記微生物を培養するには、通常の固体培養法で培養しても良いが、集菌の際の効率を考慮すると液体培養法を採用して培養するのが好ましい。また、培地としては、酵母エキス、ペプトン、トリプトン、又は肉エキスを塩化ナトリウム（NaCl）を加えた培地が用いられる。具体的にはL-broth（バクト・トリプトン1%、バクト・イースト・エキストラクト0.5%、NaCl 0.5%、ブドウ糖0.1%、pH=7.2）である。なお、培地の初発pHは、6～8に調製するのが適当である。また培養は30～42℃、好ましくは37℃前後で4～24時間、通気かく拌深部培養、振とう培養または静置培養等により行う。なお、*E. coli* MI162株は、*E. coli* Genetic Stock Center（米国コネチカット州）より入手可能である。同株の索引番号はCGSC5919である。同株の詳しい性質は、Mol. Gen. Genet. 143, 243（1976）、J. Bacteriol., 149, 294（1982）に記載されている。

このようにして得られた培養物を、例えば3,000 r.p.m.で5分間遠心分離して*E. coli*の菌体を得る。この菌体より、例えば斎藤、三浦の方法（Biochem. Biophys. Acta., 72, 619（1963））、K. S. Kirbyの方法（Biochem. J., 64, 405,（1956））等の方法により染色体DNAを得ることができる。

こうして得られた染色体DNAから*i l v G M E D A*オペロンを単離するために、染色体DNAライブラリーを作製する。まず、染色体DNAを適当な制限酵素で部分分解して種々の断片混合物を得る。切断反応時間等を調節して切断の程度を調節すれば、幅広い種類の制限酵素が使用できる。例えば、*S a u 3 A I*を、温度30℃以上、好ましくは37℃、酵素濃度1～10ユニット/mlで様々な時間（1分～2時間）染色体DNAに作用させてこれを消化する。

ついで、切断された染色体DNA断片を、エシェリヒア属細菌細胞内で自律複製可能なベクターDNAに連結し、組換えDNAを作製する。具体的には、染色体DNAの切断に用いた制限酵素 *S a u 3 A I*と同一末端塩基配列を生じさせ

る制限酵素、例えば B a m H I を、温度 30℃ 以上、酵素濃度 1～100 ユニット/ml の条件下で 1 時間以上、好ましくは 1～3 時間、ベクター DNA に作用させてこれを完全消化し、切断開裂する。次いで、上記のようにして得た染色体 DNA 断片混合物と開裂切断されたベクター DNA を混合し、これに DNA リガーゼ、好ましくは T4 DNA リガーゼを、温度 4～16℃、酵素濃度 1～100 ユニット/ml の条件下で 1 時間以上、好ましくは 6～24 時間作用させて組換え DNA を得る。

得られた組換え DNA を用いて、エシェリヒア属の微生物、例えば E. coli M1262 株 (leuB6, ilvI614, ilvH612, λ^- , relA1, spoT1, ilvB619, ilvG603, ilvG605(am), thi-1) のようなアセトヒドロキシ酸シンターゼ欠損変異株、E. coli AB2070 株 (proA2, trp-3, hisG4, ilvE12, metE46, thi-1, ara-9, lacY1 or lacZ4, galK2, malA1, mtl-1, rpsL8 or rpsL9, ton-1, tsx-3, λ^R , λ^- , supE44) のようなトランスアミナーゼ B 欠損変異株、あるいは E. coli AB1280 株 (hisG1, ilvD16, metB1, argH1, thi-1, ara-13, lacY1 or lacZ4, gal-6, xyl-7, mtl-2, malA1, rpsL8, 9 or 17, tonA2, λ^R , λ^- , supE44) のようなジヒドロキシ酸デヒドラターゼ欠損変異株を形質転換して染色体 DNA ライブラリーを作製する。この形質転換は D. M. Morrison の方法 (Methods in Enzymology 68, 326, 1979) あるいは受容菌細胞を塩化カルシウムで処理して DNA の透過性を増す方法 (Mandel, M. and Higa, A., J. Mol., Biol., 53, 159(1970)) 等により行うことができる。なお、E. coli M1262 株は、E. coli Genetic Stock Center (米国コネチカット州) より入手可能である。同株の索引番号は CGSC5769 である。同株の詳細な性質は、Mol. Gen. Genet., 156, 1(1977) に記載されている。E. coli AB2070 株は、E. coli Genetic Stock Center (米国コネチカット州) より入手可能である。同株の索引番号は CGSC2070 である。同株の詳細な性質は、J. Bacteriol., 109, 730 (1972) に記載されている。

ところで、i l v G M E D A オペロンの全塩基配列は明らかにされている (Nucleic Acids Res. 15, 2137 (1987)) ので、特定の制限酵素を選んで染色体 DNA を消化することにより、目的とする遺伝子が存在する DNA 断片を特定の長さのものとすることができる。同特定の長さを有する DNA 断片だけをベクター D

NAに連結して組換えDNAを作成し、同組換えDNAを用いて染色体DNAライブラリーを作成する方が、より効率よく目的とする遺伝子が存在するDNA断片を取得することができる。

得られた染色体DNAライブラリーの中から、アセトヒドロキシ酸シンターゼ活性が増大した株あるいはアセトヒドロキシ酸シンターゼ遺伝子欠損に起因する栄養要求性が相補された株を選択し、i l v GM遺伝子を含む組換えDNAをもつ菌株を得る。

得られた染色体DNAライブラリーの中から、トランスアミナーゼB活性が増大した株あるいはトランスアミナーゼB遺伝子欠損に起因する栄養要求性が相補された株を選択し、i l v E遺伝子を含む組換えDNAをもつ菌株を得る。

得られた染色体DNAライブラリーの中から、ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ活性が増大した株あるいはジヒドロキシ酸デヒドラターゼ遺伝子欠損に起因する栄養要求性が相補された株を選択し、i l v D遺伝子を含む組換えDNAをもつ菌株を得る。

i l v GM遺伝子を含む組換えDNAをもつ候補株が、i l v GM遺伝子がクローニングされた組換えDNAを保持するかどうかを確認するには、候補株から細胞抽出液を調製し、それより粗酵素液を調製してアセトヒドロキシ酸シンターゼ活性が増大していることを確認することにより達成できる。アセトヒドロキシ酸シンターゼの酵素活性測定法は、M. D. Feliceらの方法により行うことができる (Methods in Enzymology 166, 241)。

また、アセトヒドロキシ酸シンターゼ欠損変異株はイソロイシン、ロイシン及びバリン要求性であるので、アセトヒドロキシ酸シンターゼ欠損変異株を宿主に用いた場合は、バリンを含有しない最少培地上で生育可能となった菌株を単離し、該菌株から組換えDNAを回収することにより、i l v GM遺伝子を含むDNA断片を得ることができる。

あるいは、i l v GM遺伝子を含むDNAの塩基配列はR. P. Lawtherらによってすでに報告されている (Nucleic Acids Res. 15, 2137 (1987))。そこで、候補株から組換えDNAを単離して、その塩基配列を解読して、同報告にある塩基配列と比較することによっても確認が行える。

上述した通り、*E. coli* K-12株の *i l v G* 遺伝子のオープン・リーディング・フレーム内部には変異が生じている。その結果フレームシフトが起き、さらに途中に終始コドンが出現するために翻訳が終了してしまう。すなわち、*i l v G* 遺伝子の開始コドンのATG（1～3番目）から数えて982～984番目に終始コドンが出現している。したがって、同株より取得した *i l v G M* 遺伝子を用いる場合には、サイト・ダイレクティッド・ミュータジェネシス法により変異部分を正常に戻す必要がある。たとえばエシェリヒア・コリ M I 1 6 2 株の *i l v G* 遺伝子 (*ilvG* 603) では、982～984番目にある終始コドンTGAの前に、TGの2塩基対が挿入されて、フレームが正常に戻っている。その他については J. Bacteriol. 149, 294 (1982) の Fig. 2 に詳しく記載されている。

i l v E 遺伝子を含む組換えDNAをもつ候補株が、*i l v E* 遺伝子がクローニングされた組換えDNAを保持するかどうかを確認する方法は以下の通りである。トランスアミナーゼB欠損変異株はイソロイシン要求性であるので、トランスアミナーゼB欠損変異株を宿主に用いた場合は、イソロイシンを含有しない最少培地上で生育可能となった菌株を単離し、該菌株から組換えDNAを回収することにより、*i l v E* 遺伝子を含むDNA断片を得ることができる。

あるいは、*i l v E* 遺伝子を含むDNAの塩基配列はR. P. Lawtherらによってすでに報告されている (Nucleic Acids Res. 15, 2137 (1987))。そこで、候補株から組換えDNAを単離して、その塩基配列を解読して、同報告にある塩基配列と比較することによっても確認が行える。

i l v D 遺伝子を含む組換えDNAをもつ候補株が、*i l v D* 遺伝子がクローニングされた組換えDNAを保持するかどうかを確認する方法は以下の通りである。ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ欠損変異株はイソロイシン、ロイシン、バリン要求性であるので、ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ欠損変異株を宿主に用いた場合は、バリンを含有しない培地上で生育可能となった菌株を単離し、該菌株から組換えDNAを回収することにより、*i l v D* 遺伝子を含むDNA断片を得ることができる。

あるいは、*i l v D* 遺伝子を含むDNAの塩基配列はR. P. Lawtherらによってすでに報告されている (Nucleic Acids Res. 15, 2137 (1987))。そこで、候補

株から組換えDNAを単離して、その塩基配列を解読して、同報告にある塩基配列と比較することによっても確認が行える。

上記菌株おのおのより、組換えDNAを、例えば P. Guerry らの方法 (J. Bacteriol., 116, 1064 (1973))、D. B. Clewell の方法 (J. Bacteriol., 110, 667 (1972)) などにより単離することができる。

i l v G M E D A オペロン全長を得るには、i l v G M 遺伝子を有する DNA 断片、i l v E 遺伝子を有する DNA 断片、及び i l v D 遺伝子を有する DNA 断片を連結する。連結するときには、R. P. Lawther らによってすでに報告されている (Nucleic Acids Res. 15, 2137 (1987)) i l v G M E D A オペロン全塩基配列を参考にできる。

野生型 i l v G M E D A オペロンの取得は、染色体上に野生型 i l v G M E D A オペロンを有する株から、斎藤、三浦の方法等により染色体 DNA を調製し、ポリメラーゼチェーンリアクション法 (PCR: polymerase chain reaction; White, T. J. et al; Trends Genet. 5, 185 (1989) 参照) により、i l v G M E D A オペロンを増幅することによっても行える。増幅反応に用いる DNA プライマーは、i l v G M E D A オペロンの全領域あるいは一部領域を含有する DNA 二重鎖の両 3' 末端に相補するものを用いる。i l v G M E D A オペロンの一部領域だけを増幅した場合には、該 DNA 断片をプローブとして全領域を含む DNA 断片を染色体 DNA ライブラリーよりスクリーニングする必要がある。i l v G M E D A オペロンの全領域を増幅した場合には、増幅された i l v G M E D A オペロンを含有する DNA 断片を含む PCR 反応液をアガロースゲル電気泳動に供した後、目的の DNA 断片を抽出することによって i l v G M E D A オペロンを含有する DNA 断片を回収できる。この場合においても、L-バリン生産菌の取得に際しては i l v A 遺伝子は必須ではないので、i l v G M E D 部分のみを増幅してもよい。

DNA プライマーを作製するには、R. P. Lawther らによってすでに報告されている (Nucleic Acids Res. 15, 2137 (1987)) E. coli の i l v G M E D A オペロン全塩基配列を参考にできる。

プライマー DNA の合成は、ホスホアミダイド法 (Tetrahedron Letters, 22, 1

859(1981)参照)等の常法により、市販のDNA合成装置(例えば、Applied Biosystems社製DNA合成機 model 380B等)を用いて合成することができる。また、PCR反応は、市販のPCR反応装置(パーキンエルマー社製DNAサーマルサイクラー PJ2000型等)を使用し、Taq DNAポリメラーゼ(宝酒造(株)より供給されている)を用い、供給者により指定された方法に従って行うことができる。

PCR法により増幅された*ilvGMEDA*オペロンは、エシェリヒア属細菌細胞内において自律複製可能なベクターDNAに接続し、エシェリヒア属細菌細胞に導入することによって、*ilvA*遺伝子への変異の導入操作およびアテニュエーションに必要な領域の除去操作等がしやすくなる。用いられるベクターDNAと形質転換法、さらに*ilvGMEDA*オペロンの存在の確認方法は上述した方法と同じである。

*ilvGMEDA*オペロンの供与菌として、*E. coli* K-12株、*E. coli* W3110株、*E. coli* MC1061株等を使用した場合には、上述したように*ilvG*遺伝子のオープン・リーディング・フレーム内部にフレームシフト変異が存在しているので、この変異部分をサイト・ダイレクティッド・ミュータジェネシス法等により正常に戻す必要がある。*E. coli* M1162株(*thr-10*, *car-94*, λ^- , *relA1*, *ilvG603*, *thi-1*)、*E. coli* B株等をDNA供与菌とした場合には、*ilvG*遺伝子はそのまま使用することができる。

(ii) *ilvGMEDA*オペロンのアテニュエーションに必要な領域の除去

*ilvGMEDA*オペロンからアテニュエーションに必要な領域を除去する、すなわち*ilvGMEDA*オペロンにアテニュエーションが起こらないような変異を導入するには、*ilvGMEDA*オペロンの5'上流域に存在するアテニュエーター全部、一部または近傍部分を除去するものの他に、アテニュエーター内部に新たなDNA断片を挿入するものも含まれる。なお、ここで「アテニュエーター」とは、ロー非依存型のターミネーター様シュテム/ループを形成する塩基配列である。たとえば配列表配列番号1に記載される塩基配列の1081番目から1104番目にいたる部分である。

アテニュエーターを除去するためには i l v G M E D A オペロンのうちアテニュエーター部よりも上流域の DNA 断片を調製し、また i l v G M E D A オペロンのうちアテニュエーター部よりも下流域の DNA 断片を調製して両者を連結すればよい。例えば i l v G M E D A オペロンのうちアテニュエーター部よりも上流域の DNA 断片は、完全長の i l v G M E D A オペロンを含む DNA 断片を適当な制限酵素で切断することによって調製できる。あるいは、i l v G M E D A オペロンのうちアテニュエーター部よりも上流域の DNA 断片を PCR 法によって増幅してもよい。PCR 法に用いるプライマー DNA は、R. P. Lawther らによってすでに報告されている (Nucleic Acids Res. 15, 2137 (1987)) 塩基配列、G. Coppola らによってすでに報告されている (Gene 97, 21 (1991)) 塩基配列を基にして化学合成してもよい。さらには、i l v G M E D A オペロンのうちアテニュエーター部よりも上流域の DNA 断片を化学合成してもよい。

i l v G M E D A オペロンのうちアテニュエーター部よりも下流域の DNA 断片を調製する方法も同様である。

i l v G M E D A オペロンを出発材料にして、アテニュエーターの一部または近傍部分が除去された i l v G M E D A オペロンを調製することにより i l v G M E D A オペロンが得られる場合がある。アテニュエーターの位置および塩基配列は R. P. Lawther らによってすでに報告されている (Nucleic Acids Res. 15, 2137 (1987)) ので、この配列を基にして除去する DNA を決定する。

除去する DNA は、アテニュエーターがロー非依存型のターミネーター様 システム/ループを形成するために必要な DNA 部分か、同システム/ループの上流に位置する連続するバリン残基をコードする領域を含む適当な DNA 部分か、あるいはその両方を含む DNA 部分が好ましい。アテニュエーターの一部または近傍部分を除去するためには i l v G M E D A オペロンのうち除去される DNA 部分よりも上流域の DNA 断片を調製し、また i l v G M E D A オペロンのうち除去される DNA 部分よりも下流域の DNA 断片を調製して両者を連結すればよい。例えば i l v G M E D A オペロンのうち除去される DNA 部分よりも上流域の DNA 断片は、完全長の i l v G M E D A オペロンを含む DNA 断片を適当な制限酵素で切断することによって調製できる。あるいは、i l v G M E D A オペロン

のうち除去されるDNA部分よりも上流域のDNA断片をPCR法によって増幅してもよい。PCR法に用いるプライマーDNAは、R. P. Lawtherらによってすでに報告されている (Nucleic Acids Res. 15, 2137 (1987)) 塩基配列、G. Coppolaらによってすでに報告されている (Gene 97, 21 (1991)) 塩基配列を基にして化学合成してもよい。さらには、i l v G M E D Aオペロンのうち除去されるDNA部分よりも上流域のDNA断片を化学合成してもよい。

i l v G M E D Aオペロンのうち除去されるDNA部分よりも下流域のDNA断片を調製する方法も同様である。

i l v G M E D Aオペロンを出発材料にして、アテニュエーター内部に新たなDNA断片が挿入されたi l v G M E D Aオペロンを調製することによりi l v G M E D Aオペロンが得られる場合がある。アテニュエーターの位置および塩基配列は、R. P. Lawtherら、あるいはG. Coppolaらによってすでに報告されているので、この配列を基にして挿入される新たなDNA断片の挿入位置および挿入されるDNA断片の塩基配列を決定する。

挿入される新たなDNA断片は、アテニュエーターがロー非依存型のターミネーター様シュテム／ループを形成するために必要なDNA部分か、あるいは同シュテム／ループの上流に位置する連続するバリン残基をコードするDNA部分に挿入されることが好ましい。挿入の結果、アテニュエーターがロー非依存型のターミネーター様シュテム／ループを形成できなくなることがあり、このためアテニュエーターが機能しなくなることが期待されるからである。

挿入される新たなDNA断片の塩基配列は、挿入されたときにアテニュエーターがロー非依存型のターミネーター様シュテム／ループを形成しないように設計され、挿入されたときに同シュテム／ループの上流に連続するバリン残基が位置しないように設計されることが好ましい。

アテニュエーターの内部に新たなDNA断片を挿入するためには、i l v G M E D Aオペロンのうち新たなDNA断片が挿入されるDNA部分よりも上流域のDNA断片を調製し、またi l v G M E D Aオペロンのうち新たなDNA断片が挿入されるDNA部分よりも下流域のDNA断片を調製して、さらに挿入される新たなDNA断片を調製して3者を連結すればよい。例えばi l v G M E D Aオ

ペロンのうち新たなDNA断片が挿入されるDNA部分よりも上流域のDNA断片は、完全長の*i l v G M E D A*オペロンを含むDNA断片を適当な制限酵素で切断することによって調製できる。あるいは、*i l v G M E D A*オペロンのうち新たなDNA断片が挿入されるDNA部分よりも上流域のDNA断片をPCR法によって増幅してもよい。PCR法に用いるプライマーDNAは、R. P. Lawtherらによってすでに報告されている (Nucleic Acids Res. 15, 2137 (1987)) 塩基配列、G. Coppolaらによってすでに報告されている (Gene 97, 21 (1991)) 塩基配列を基にして化学合成してもよい。さらには、*i l v G M E D A*オペロンのうち新たなDNA断片が挿入されるDNA部分よりも上流域のDNA断片を化学合成してもよい。

*i l v G M E D A*オペロンのうち新たなDNA断片が挿入されるDNA部分よりも下流域のDNA断片を調製する方法も同様である。

挿入される新たなDNA断片は化学合成によって調製できる。

また、*i l v G M E D A*オペロンのうち新たなDNA断片が挿入されるDNA部分よりも上流域のDNA断片、あるいは*i l v G M E D A*オペロンのうち新たなDNA断片が挿入されるDNA部分よりも下流域のDNA断片をPCR法によって増幅する際に、プライマーDNAに挿入される新たなDNA断片を連結しておくこともできる。例えば、*i l v G M E D A*オペロンのうち新たなDNA断片が挿入されるDNA部分よりも上流域のDNA断片を増幅するために用いる3'側DNAプライマーに、挿入される新たなDNA断片の片方の鎖を連結する。同様にして*i l v G M E D A*オペロンのうち新たなDNA断片が挿入されるDNA部分よりも下流域のDNA断片を増幅するために用いる5'側DNAプライマーに、挿入される新たなDNA断片の相補鎖を連結する。これらのプライマーを用いて増幅される2種のDNA断片を連結する。

(iii) スレオニンデアミナーゼの不活性化

取得した*i l v*オペロンが*i l v A*遺伝子を含んでいる場合には、スレオニンデアミナーゼ活性を発現しないように、*i l v A*遺伝子を除去し、あるいは発現されるスレオニンデアミナーゼが不活性化されるように*i l v A*遺伝子内部に変

異、挿入、欠失等を起こさせるように、i l v A遺伝子を改変する。改変法としては、例えばi l v A遺伝子内部に存在する制限酵素部位を切断し、切断点よりも下流のDNA断片を除去する方法が挙げられる。i l v A遺伝子を2箇所の制限酵素部位で切断し、再連結することによってDNA断片を切り出してもよい。また、前記制限酵素部位に合成DNA等の他のDNA断片を挿入することによって、発現されるスレオニンデアミナーゼを不活性化することができる。制限酵素切断部位が粘着末端である場合には、この粘着末端を平滑化した後、末端同士を連結することによっても、発現されるスレオニンデアミナーゼを不活性化することができる。さらに、部位特異的変異導入等によってもスレオニンデアミナーゼを不活性化することができる。

以下、アテニュエーションが解除され、かつ、スレオニンデアミナーゼ活性を発現しないi l v G M E D Aオペロンまたはi l v Aを欠失したi l v G M E Dオペロンを、解除型i l v G M E D A*オペロンという。ここで、「A*」は、i l v A遺伝子の欠失、または活性を有しないスレオニンデアミナーゼまたはその一部をコードするi l v A遺伝子を表す。

(iv) エシェリヒア属に属する微生物への解除型i l v G M E D A*オペロンの導入

上記のようにして得られる解除型i l v G M E D A*オペロンを含むDNA断片を組換えDNAとして、適当な宿主微生物に導入し、発現させることにより、i l v G M E D A*オペロンにコードされるバリン生合成系の酵素群の発現が増強された微生物を取得できる。宿主としては、エシェリヒア属に属する微生物が好ましく、例えばエシェリヒア・コリがあげられる。

また、組換えDNAから解除型i l v G M E D A*オペロンを取り出し、他のベクターDNAに挿入したものを使用してもよい。本発明において用いることのできることのできるベクターDNAとしては、プラスミドベクターDNAが好ましく、例えばpUC19、pUC18、pBR322、pHSG299、pHSG298、pHSG399、pHSG398、RSF1010、pMW119、pMW118、pMW219、pMW218等が挙げられる。他にもファージDNAのベクターも利用できる。

さらに、解除型 i l v G M E D A*オペロンの発現を効率的に実施するために、解除型 i l v G M E D A*オペロンの上流に l a c、t r p、P_L等の微生物内で働く他のプロモーターを連結してもよく、i l v G M E D A*オペロン固有のプロモーターをそのまま、あるいは増幅して用いてもよい。

また、上記のように、解除型 i l v G M E D A*オペロンを含むDNA断片を自律複製可能なベクターDNAに挿入したものを宿主に導入し、プラスミドのような染色体外DNAとして宿主に保持させてもよいが、解除型 i l v G M E D A*オペロンを含むDNA断片を、トランスダクション、トランスポゾン (Berg, D. E. and Berg, C. M., Bio/Technol., 1,417(1983))、Muファージ (特開平2-109985号公報) または相同性組換え (Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Lab. (1972)) を用いた方法で宿主微生物の染色体に組み込んでもよい。宿主に導入する解除型 i l v G M E D A*オペロンの数は、1つでもよく、複数でもよい。

上記のようにして解除型 i l v G M E D A*オペロンを含むDNA断片を、リポ酸要求性の、又は／及びH⁺-A T P a s eを欠損したエシェリヒア属に属する微生物に導入することにより、L-バリン生産菌が得られる。解除型 i l v G M E D A*オペロンを含むDNA断片を導入したエシェリヒア属に属する微生物に、リポ酸要求性又は／及びH⁺-A T P a s e欠損を導入してもL-バリン生産菌は得られる。

〔2〕L-ロイシン生産菌

後記実施例に示すように、リポ酸要求性またはH⁺-A T P a s eを欠損したエシェリヒア属に属する微生物は、L-バリン生産性を向上させることができることが明らかとなった。このことは、リポ酸要求性変異により、あるいはH⁺-A T P a s e欠損変異によって、細胞内の代謝の流れがL-バリン合成が進む方向に傾いた結果であることを示唆している。したがって、L-バリン生合成系の最終中間体から分岐する合成経路を有するL-ロイシンの生合成も、リポ酸要求性変異又は／及びH⁺-A T P a s e欠損変異によって促進されると考えられる。したがって、L-ロイシン生産能をリポ酸要求性変異株、H⁺-A T P a s e欠損変異

株、又はリポ酸要求性-H⁺-ATPase欠損変異をともに有する変異株に付与または増強すれば、L-ロイシン生産能を付与又は増強できることが期待される。

L-ロイシンの生産能の付与または増強は、例えば、上記L-バリン生産に必要な性質に加えて、制御機構が実質的に解除されたL-ロイシン生合成系遺伝子をエシェリヒア属に属する微生物に導入することによって行われる。また、エシェリヒア属に属する微生物が保持するL-ロイシン生合成系遺伝子の制御機構が実質的に解除されるような変異を導入してもよい。このような遺伝子として、例えば、L-ロイシンによる阻害が実質的に解除されたleuA遺伝子が挙げられる。

尚、本発明の微生物は、以上のようなL-バリン生産能あるいはL-ロイシン生産能に加えて、アミノ酸生産能の向上に有効な公知の性質、例えば各種栄養要求性、薬剤耐性、薬剤感受性、薬剤依存性等の性質あるいは遺伝子工学的手法により、アミノ酸の生合成を向上させる遺伝子が増幅されている特徴を併せ持っていてよい。

< 2 > 本発明のL-バリンまたはL-ロイシンの製造法

本発明によるL-バリンまたはL-ロイシンの製造は、本発明の微生物を液体培地で培養し、培養液中にL-バリンまたはL-ロイシンを生成蓄積せしめ、この培養液からL-バリンまたはL-ロイシンを採取することによって行うことができる。この際、L-バリンの製造には本発明のL-バリン生産菌を、L-ロイシンの製造には本発明のL-ロイシン生産菌を使用する。

本発明の製造法におけるL-バリン生産菌またはL-ロイシン生産菌の培養および培養液からのL-バリンまたはL-ロイシンの採取、精製等は、従来の微生物を用いた発酵法によるアミノ酸の製造法と同様に行えばよい。培養に使用する培地としては、炭素源、窒素源、無機物を含有し、必要があれば使用菌株が生育に要求する栄養源を適当量含有するものであれば、合成培地でも天然培地でもよい。炭素源としては、グルコースやジェークロースをはじめとする各種炭水化物、各種有機酸があげられる。また使用する微生物の資化性によってはエタノールやグリセロール等のアルコールを用いることが出来る。窒素源としては、

アンモニアや、硫酸アンモニウム等の各種のアンモニウム塩類や、アミン類その他の窒素化合物や、ペプトン、大豆加水分解物、発酵菌体分解物等の天然窒素源を用いることが出来る。無機物としては、磷酸一カリウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、炭酸カルシウム等が用いられる。

培養は、振盪培養、通気攪拌培養等の好氣的条件下で行うことが好ましく、培養温度は20～40℃で、好ましくは30～38℃の範囲で行う。培地のpHは通常5～9の範囲であり、6.5～7.2の範囲が好ましい。培地のpHは、アンモニア、炭酸カルシウム、各種酸、各種塩基、緩衝液などによって調整することができる。通常、1～3日の培養によって、培養液中に目的とするL-バリンまたはL-ロイシンが蓄積する。

培養終了後、培養液から菌体などの固形物を遠心分離や膜分離法で除去し、イオン交換法、濃縮法、晶析法等によって目的とするL-バリンまたはL-ロイシンを採取、精製することが出来る。

図面の簡単な説明

図1は、プラスミドpHSGSKを構築する手順を示す図である。

図2は、プラスミドpdGM1を構築する手順を示す図である。

図3は、プラスミドpMWGMA2を構築する手順を示す図である。

図4は、プラスミドpMWD5を構築する手順を示す図である。

図5は、プラスミドpMWdAR6を構築する手順を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の実施例を説明する。

実施例1 L-バリン生産菌の創製

1. 解除型ilvGMEDオペロン発現プラスミドpMWdAR6の構築

エシェリヒア・コリMI162株より、染色体DNAを抽出した。該染色体D

NAを制限酵素HindIIIで切断した。i l v GM遺伝子を含むHindIII-HindIII DNA断片は4.8 kbの長さであることが判明している。そこで4.8 kb前後の長さを有するHindIII-HindIII DNA断片と、プラスミドベクターpBR322（宝酒造（株）より購入）をHindIIIで切断して得られるDNA断片とを連結した。

得られたDNA連結反応混合物を、アセトヒドロキシ酸シンターゼ欠損株であるエシェリヒア・コリMI262株に導入した。形質転換されてアセトヒドロキシ酸シンターゼ欠損の形質が相補された株を選択し、その株が保有するプラスミドを単離した。同プラスミドの構造を解析した結果、pBR322のHindIII部位にi l v GM遺伝子及びi l v E遺伝子の5'末端側の一部を含む4.8 kbのDNA断片が挿入されていた。同プラスミドをpBRGM7と命名した。

Gene 97, 21, (1991)、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 922, (1981)とJ. Bacteriol. 149, 294, (1982)に報告されているi l v GM遺伝子の塩基配列を参考にして、配列表配列番号3と配列番号4に記載した合成オリゴヌクレオチドDNAを合成した。両DNAをプライマーとして、MI162株の染色体DNAを鋳型として、PCR法にてDNAの増幅を行った。増幅されるDNA断片は配列表配列番号1に記載される塩基配列のうち25番目から952番目の配列を有するDNA断片である。同断片を断片（A）とする。

同様に、Gene 97, 21, (1991)、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 922, (1981)とJ. Bacteriol. 149, 294, (1982)に報告されている塩基配列を参考にして、配列表配列番号5と配列番号6に記載した合成オリゴヌクレオチドDNAを合成した。両DNAをプライマーとして、MI162株の染色体DNAを鋳型として、PCR法にてDNAの増幅を行った。増幅されるDNA断片は配列表配列番号1に記載される塩基配列のうち1161番目から2421番目の配列を有するDNA断片である。同断片を断片（B）とする。

断片（A）をSmaIで消化して得られる大断片と、ベクターpUC18（宝酒造）をSmaIで消化して得られるDNA断片とを連結してプラスミドpUCAを作成した。断片（B）をKpnIで消化して得られる大断片と、pHSG399（宝酒造）をHincII及びKpnIで消化して得られる大断片とを連結し

てプラスミドpHSGGBを作成した。

プラスミドpUCAをKpn Iで消化し、DNAポリメラーゼIの大フラグメント（クレノーフラグメント）を用いて切断端を平滑末端化し、さらにPst Iで消化し、最終的に断片（A）を含むDNA断片を単離した。プラスミドpHSGGBをHind IIIで消化し、DNAポリメラーゼIの大フラグメント（クレノーフラグメント）を用いて切断端を平滑末端化し、さらにPst Iで消化し、最終的に断片（B）を含むDNA断片を単離した。両DNA断片を連結し、プラスミドpHSGSKを作成した。

pHSGSKに搭載される、断片（A）及び断片（B）に由来するSma I—Kpn I断片を断片（C）と命名した。断片（C）は、ilvGM遺伝子を含む4.8kbのHind III—Hind III断片をSma IとKpn Iで切断して得られる断片に相当し、プロモーター、SD配列及びilvG遺伝子上流域を含むが、リーダー配列からアテニューエーター領域に至る配列約0.2kbを欠いている。以上、pHSGSKを構築する手順を図1にまとめた。

プラスミドpHSGSKをSma IとKpn Iで消化することにより断片（C）を得、プラスミドpBRGM7をSma IとKpn Iで消化することにより大DNA断片を得、両者を連結した。得られたプラスミドをpdGM1と命名した。pdGM1に搭載される、ilvGM遺伝子を含む4.6kbのHind III—Hind III断片は、アテニューエーションに必要な領域を欠いている。アテニューエーションに必要な領域を欠いたilvGM遺伝子を、本実施例及び図面において「ΔattGM」と表現する。以上、pdGM1を構築する手順を図2にまとめた。

特開平2-458号公報に記載されているプラスミドpDRIA4は、エシェリヒア属細菌で自律複製可能でありかつブレヴィバクテリウム属細菌で自律複製可能なシャトルベクターpDR1120と、*E. coli* K-12由来のスレオニンデアミナーゼをコードするilvA遺伝子及びilvD遺伝子の3'末端側の一部を含むBamH I—BamH I断片とが結合されて調製される。なお同BamH I—BamH I断片は、特開平2-458号公報では、2.3kbと記載されているが、現在では2.75kbであることが判明している。プラスミドpDRIA4

はブレバクテリウム・フラバムAJ12358 (FERM P-9764) あるいはブレバクテリウム・フラバムAJ12359 (FERM P-9765) の染色体DNA外に存在する。これらの株から常法によりプラスミドpDRIA4を調製できる。尚、pDRIA4が有する*ilvA*遺伝子がコードするスレオニンデアミナーゼは、L-イソロイシンによるフィードバック阻害が解除されているが、本発明においてはこのフィードバック阻害の解除は必須ではない。

プラスミドpDRIA4上のBamHI-BamHI 2.75 kbのDNA断片中、L-イソロイシンによる阻害が実質的に解除されたスレオニンデアミナーゼをコードする*ilvA*遺伝子を含むHindIII-BamHI断片を調製し、ベクターpMW119 (ニッポンジーン社製) をHindIII及びBamHIで切断して得られるDNA断片と連結した。こうして作製されたプラスミドをpMWA1と命名した。

プラスミドpMWA1をHindIIIで切断して得られるDNA断片と、プラスミドpdGM1をHindIIIで切断して得られる*ilvGM*遺伝子を含むDNA断片とを連結した。プラスミド上に存在する制限酵素認識部位の位置を解析することによって、*ilvGM*遺伝子の転写方向と*ilvA*遺伝子の転写方向とが同方向となったものを選択し、これをプラスミドpMWGMA2と命名した。pMWGMA2は、アテニューエーターを除去された*ilvGM*遺伝子、*ilvE*遺伝子の5'末端側の一部、及び*ilvD*遺伝子の3'末端側の一部を有している。以上、pMWGMA2を構築する手順を図3にまとめた。

エシェリヒア・コリMI162株の染色体DNAを調製し、これをSalI及びPstIで切断してDNA断片混合物を調製した。一方、ベクターpUC19 (宝酒造社) をSalI及びPstIで切断してDNA断片を調製した。DNA断片混合物とpUC19が切断されて得られるDNA断片とを連結し、DNA混合物を得た。同DNA混合物を、トランスアミナーゼB欠損株であるAB2070株 (J. Bacteriol. 109, 703, 1972、エシェリヒア・コリ ジェネティックスストックセンターから分譲。CGSC2070) に導入し、形質転換されて分岐鎖アミノ酸要求性が回復した株を選択した。同株よりプラスミドを調製したところ、プラスミドpUC19がSalI及びPstIで切断して得られるDNA断片と、

i l v E遺伝子を含むS a l I - P s t I DNA断片が連結されていた。このプラスミドをp U C E 1と命名した。p U C E 1は、i l v M遺伝子の3' 末端側の一部、i l v E遺伝子、及びi l v D遺伝子の5' 末端側の一部を有している。

p M W G M A 2をH i n d I I Iで部分消化してDNA断片混合物を調製した。一方、p U C E 1をH i n d I I Iで切断し、i l v E遺伝子の一部とi l v D遺伝子の5' 末端側の一部とを含む1. 7 k bのH i n d I I I - H i n d I I I DNA断片を調製した。両者を連結して得られるDNA混合物を用いてジヒドロキシ酸デヒドラターゼ (i l v D遺伝子産物) 欠損株A B 1 2 8 0株を形質転換し、形質転換された株のうち分岐鎖アミノ酸要求性が消失したものを選択した。同形質転換株から、プラスミドを調製したところ、p M W G M A 2が Δ a t t G Mとi l v Aとの間に存在するH i n d I I I部位でのみ切断されて得られるDNA断片と、p U C E 1に由来するi l v E遺伝子の一部とi l v D遺伝子的一部分とを含む1. 7 k bのH i n d I I I - H i n d I I I DNA断片が連結されており、i l v G M E D Aオペロンが再生されていた。こうして得られるプラスミドをp M W D 5と命名した。以上、p M W D 5を構築する手順を図4にまとめた。

以上の様にして得られたプラスミドp M W D 5は、p M W 1 1 9をベクターとしており、アテニュエーションに必要な領域が除去されたi l v G M E D Aオペロンを搭載したプラスミドである。

次に、こうして得られたプラスミドp M W D 5をS n a B Iで完全消化した後、A c c I I Iで部分消化した。得られたDNA断片を再環化しi l v A遺伝子のみが破壊されたプラスミドp M W d A R 6を得た(図5)。この様にして得られたプラスミドp M W d A R 6はアテニュエーションに必要な領域を欠き、且つi l v A遺伝子が破壊されたi l v G M E D Aオペロンを有するプラスミドである。

2. L-バリン生産菌の創製

上記のようにして得られたi l v G M E D Aオペロン発現プラスミドp M W d A R 6を用いて、リポ酸要求性変異株 E. coli W1485lip2 (ATCC25645)、 H^+ -A T P a s e 欠損変異株 E. coli W1485atpA401、リポ酸要求性- H^+ -A T P a s e 欠

損変異株 *E. coli* AJ12631 (FERM P-12381)、及び野生株 *E. coli* W1485 (ATCC12435)をそれぞれ形質転換し、以下の形質転換株を得た。

- 1) *E. coli* W1485 / pMWdAR6
- 2) *E. coli* W1485atpA401 / pMWdAR6
- 3) *E. coli* W1485lip2 / pMWdAR6
- 4) *E. coli* AJ12631 / pMWdAR6

E. coli AJ12631は、*E. coli* W1485lip2 (ATCC25645)に、*E. coli* AN718 (CGS C6308)に由来する H^+ -ATPaseのF1の α サブユニットに変異を有する変異遺伝子であるatpA401をPlkcファージ (IF020008) によって形質導入することによって得られた株である (特開平5-137568参照)。 H^+ -ATPase欠損変異を有する形質導入株の選択は、atpA401遺伝子の近傍に位置するbgl遺伝子をマーカーとして利用した。bgl遺伝子は、ホスホ β -グルコシダーゼをコードしており、野生型bgl遺伝子 (bgl⁻) を有する*E. coli*はサリシンを資化できないが、変異bgl遺伝子 (bgl⁺) を有する*E. coli*はサリシンを唯一の炭素源として生育できるようになり、平板培地にプロモチムールブルー (BTB) を添加しておくでサリシン資化性株のコロニーは自ら生産した有機酸によって黄色に着色する。したがって、変異型bgl遺伝子 (bgl⁺) とatpA401遺伝子を連鎖形質導入すれば、 H^+ -ATPase欠損変異株を効率よく選択することができる。まず、*E. coli* AN718からサリシン資化性 (bgl⁺) 株を分離し、続いてAN718(bgl⁺)株にPlkcを感染させ、得られた溶菌液を用いて*E. coli* W1485lip2の形質導入を行った。得られた形質導入株のリポ酸要求性及び H^+ -ATPase活性を調べ、リポ酸要求性及び H^+ -ATPase欠損変異のいずれをも保持していることを確認した。

E. coli W1485atpA401は、同様にして*E. coli* W1485にatpA401を形質導入して得られた株である。

実施例2 L-バリンの製造

実施例1で得られたL-バリン生産菌のL-バリン生産性を評価した。バクト

トリプトン1%、酵母エキス0.5%、NaCl0.5%、寒天1.5%、アンピシリン100 μ g/mlからなる組成の培地に各形質転換株を塗布し、37°Cで18ないし24時間培養後、その一部を白金耳で20mlの発酵培地（グルコース4%、硫酸アンモニウム1.6%、リン酸二水素カリウム0.1%、硫酸マグネシウム7水塩0.1%、硫酸第一鉄7水塩0.001%、硫酸マンガン5水塩0.001%、酵母エキス0.2%、バクトトリプトン0.2%、炭酸カルシウム3%、pH7.0）に接種して、37°Cで24時間振盪培養した。リポ酸要求性株の培養にはリポ酸を1 μ g/Lとなるよう添加して培養した。

菌体を除去した培養上清中のL-バリン濃度を、陽イオンカラム（CPK08：旭化成（株）製）を用いた高速液体クロマトグラフィーにて測定した。結果を表1に示す。

表1 各種菌株のL-バリン生産性

<u>E. coli</u> 形質転換体	L-バリン生産量(g/L)
W 1 4 8 5	0. 1
W 1 4 8 5 / pMWdAR6	6. 9
W 1 4 8 5 atpA401 / pMWdAR6	8. 0
W 1 4 8 5 lip2 / pMWdAR6	7. 8
A J 1 2 6 3 1 / pMWdAR6	9. 2

この結果から、リポ酸要求性変異及び／又はH⁺-ATPase欠損変異を有するE. coliを宿主とし、この宿主細胞に、スレオニンデアミナーゼ活性を発現せず、アテニュエーションに必要な領域を欠損した*i l v G M E D A**オペロンを含むDNA断片を導入して得られたE. coliは、L-バリン生産性が増強されていることが明らかである。また、宿主としてリポ酸要求性であり、かつH⁺-ATPaseを欠損した株を用いると、L-バリン生産性を一層増強することができる。

産業上の利用可能性

本発明により、L-バリンまたはL-ロイシン生産菌のL-バリンまたはL-

ロイシン生産能を増強することが可能となった。本発明の微生物を用いることにより、L-バリン及びL-ロイシンを効率よく製造することができる。

配列表

(1) 一般情報

- (i) 出願人：味の素株式会社
- (ii) 発明の名称：L-バリン及びL-ロイシンの製造法
- (iii) 配列数：12
- (iv) 連絡先：
 - (A) 宛名：
 - (B) 番地：
 - (C) 市：
 - (D) 州：
 - (E) 国：
 - (F) ZIP：
- (v) コンピュータ読取り可能形式
 - (A) 媒体：フロッピーディスク
 - (B) コンピュータ：IBM PC 互換
 - (C) 操作システム：PC-DOS/MS-DOS
 - (D) ソフトウェア：FastSEQ Version 1.5
- (vi) 現行出願データ
 - (A) 出願番号
 - (B) 出願日
 - (C) 分類
- (viii) 代理人／事務所情報
 - (A) 名前：
 - (B) 登録番号：
 - (C) 整理番号：
- (ix) 通信情報
 - (A) 電話番号：
 - (B) ファクシミリ番号：

(2) 配列番号1の配列の情報：

- (i) 配列の性質：
 - (A) 配列の長さ：2841 base pairs
 - (B) 配列の型：核酸
 - (C) 鎖の数：2本鎖
 - (D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類: Genomic DNA

(iii) ハイボセティカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(vi) 起源:

(A) 生物名: エシェリヒア コリ (Escherichia coli)

(B) 株名: MI162

(ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号: CDS

(B) 存在位置: 957..1055

(C) 特徴を決定した方法: S

(ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号: attenuator

(B) 存在位置: 1081..1104

(C) 特徴を決定した方法: S

(ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号: CDS

(B) 存在位置: 1195..2841

(C) 特徴を決定した方法: S

(ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号: cleavage-site(SmaI)

(B) 存在位置: 52..57

(C) 特徴を決定した方法: S

(ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号: cleavage-site(KpnI)

(B) 存在位置: 2395..2400

(C) 特徴を決定した方法: S

(xi) 配列: SEQ ID NO:1:

CTCGCTTTCC TTGTTCTGA CCGATAACAT CACTGAGATC ATGTTGTAGC GCCCGGGATA	60
CTGCATCAGT TGGTTTCGGG CGTTCGAGAG CGTGCTTACC TTCCAGAAAC GCACAGACAG	120

CTTGCAGATG ATCGGCTATC AGGCATCCTT CACCGTTAAT TAGCCCCACT TCATCTTCGT	180
TATCTTTTCGC GACGATAATT TTTCTGCCCC ACTTAATAGC TTCAGTTGCA CTGGAGATTG	240
CGCCGGGAAC GCCACGCAGA GCGCCTGTAA GCGCCAGTTC TCCGACTAAT TCATATTCAT	300
CTAACTTATT GGCTGTAAGC TGTTCTGAGG CCGCCAGCAA CGCAATGGCG ATAGGTAAAT	360
CATATCGTCC CCCTTCTTTT GGCAGATCAG CTGGAGCCAG GTTGATGGTG ATTTTTTTCG	420
CCGGATATTC ATATCCGCTA TTGATAATGG CGCTGCGCAC GCGATCGCGA GCTTCTTTTA	480
CCGTTGTTTC TGGTAAGCCC ACCATCGTTA AGCCGGGTAG ACCTTTACTG ATATGTACCT	540
CAACAGTGAT CGGGGGCGCA TTTACTCCCA GGGCTGCGCG GGTATGAACA ATTGACAGTG	600
ACATAAGCCC TCCTTGAGTC ACCATTATGT GCATAAGATA TCGCTGCTGT AGCCCCTAA	660
TTCTGTAATT TTAGTGGCTG ATTCCTGTTT ATTTGTGCAA GTGAAGTTGA GTTGTTCTGG	720
CGGTGGAATG ATGCTCGCAA AAATGCAGCG GACAAAGGAT GAACTACGAG GAAGGGAACA	780
ACATTCATAC TGA AATTGAA TTTTTTTCAC TCACTATTTT ATTTTAAAA AACAACAATT	840
TATATTGAAA TTATTAAACG CATCATAAAA ATCGGCCAAA AAATATCTTG TACTATTAC	900
AAAACCTATG GTA AACTCTTT AGGCATTCTT TCGAACAAGA TGCAAGAAAA GACAAA	956
ATG ACA GCC CTT CTA CGA GTG ATT AGC CTG GTC GTG ATT AGC GTG GTG	1004
Met Thr Ala Leu Leu Arg Val Ile Ser Leu Val Val Ile Ser Val Val	
1 5 10 15	
GTG ATT ATT ATC CCA CCG TGC GGG GCT GCA CTT GGA CGA GGA AAG GCT	1052
Val Ile Ile Ile Pro Pro Cys Gly Ala Ala Leu Gly Arg Gly Lys Ala	
20 25 30	
TAGAGATCAA GCCTTAACGA ACTAAGACCC CCGCACCGAA AGGTCCGGGG GTTTTTTTTG	1112
ACCTTAAAAA CATAACCGAG GAGCAGACAA TGAATAACAG CACAAAATTC TGTTTCTCAA	1172
GATTCAGGAC GGGGAACTAA CT ATG AAT GGC GCA CAG TGG GTG GTA CAT GCG	1224
Met Asn Gly Ala Gln Trp Val Val His Ala	
1 5 10	
TTG CGG GCA CAG GGT GTG AAC ACC GTT TTC GGT TAT CCG GGT GGC GCA	1272
Leu Arg Ala Gln Gly Val Asn Thr Val Phe Gly Tyr Pro Gly Gly Ala	
15 20 25	

ATT ATG CCG GTT TAC GAT GCA TTG TAT GAC GGC GGC GTG GAG CAC TTG	1320
Ile Met Pro Val Tyr Asp Ala Leu Tyr Asp Gly Gly Val Glu His Leu	
30 35 40	
CTA TGC CGA CAT GAG CAG GGT GCG GCA ATG GCG GCT ATC GGT TAT GCT	1368
Leu Cys Arg His Glu Gln Gly Ala Ala Met Ala Ala Ile Gly Tyr Ala	
45 50 55	
CGT GCT ACC GGC AAA ACT GGC GTA TGT ATC GCC ACG TCT GGT CCG GGC	1416
Arg Ala Thr Gly Lys Thr Gly Val Cys Ile Ala Thr Ser Gly Pro Gly	
60 65 70	
GCA ACC AAC CTG ATA ACC GGG CTT GCG GAC GCA CTG TTA GAT TCC ATC	1464
Ala Thr Asn Leu Ile Thr Gly Leu Ala Asp Ala Leu Leu Asp Ser Ile	
75 80 85 90	
CCT GTT GTT GCC ATC ACC GGT CAA GTG TCC GCA CCG TTT ATC GGC ACT	1512
Pro Val Val Ala Ile Thr Gly Gln Val Ser Ala Pro Phe Ile Gly Thr	
95 100 105	
GAC GCA TTT CAG GAA GTG GAT GTC CTG GGA TTG TCG TTA GCC TGT ACC	1560
Asp Ala Phe Gln Glu Val Asp Val Leu Gly Leu Ser Leu Ala Cys Thr	
110 115 120	
AAG CAT AGC TTT CTG GTG CAG TCG CTG GAA GAG TTG CCG CGC ATC ATG	1608
Lys His Ser Phe Leu Val Gln Ser Leu Glu Glu Leu Pro Arg Ile Met	
125 130 135	
GCT GAA GCA TTC GAC GTT GCC TGC TCA GGT CGT CCT GGT CCG GTT CTG	1656
Ala Glu Ala Phe Asp Val Ala Cys Ser Gly Arg Pro Gly Pro Val Leu	
140 145 150	
GTC GAT ATC CCA AAA GAT ATC CAG TTA GCC AGC GGT GAC CTG GAA CCG	1704
Val Asp Ile Pro Lys Asp Ile Gln Leu Ala Ser Gly Asp Leu Glu Pro	
155 160 165 170	
TGG TTC ACC ACC GTT GAA AAC GAA GTG ACT TTC CCA CAT GCC GAA GTT	1752
Trp Phe Thr Thr Val Glu Asn Glu Val Thr Phe Pro His Ala Glu Val	
175 180 185	

GAG CAA GCG CGC CAG ATG CTG GCA AAA GCG CAA AAA CCG ATG CTG TAC	1800
Glu Gln Ala Arg Gln Met Leu Ala Lys Ala Gln Lys Pro Met Leu Tyr	
190 195 200	
GTT GGC GGT GGC GTG GGT ATG GCG CAG GCA GTT CCG GCT TTG CGT GAA	1848
Val Gly Gly Gly Val Gly Met Ala Gln Ala Val Pro Ala Leu Arg Glu	
205 210 215	
TTT CTC GCT GCC ACA AAA ATG CCT GCC ACC TGT ACG CTG AAA GGG CTG	1896
Phe Leu Ala Ala Thr Lys Met Pro Ala Thr Cys Thr Leu Lys Gly Leu	
220 225 230	
GGC GCA GTA GAA GCA GAT TAT CCG TAC TAT CTG GGC ATG CTG GGG ATG	1944
Gly Ala Val Glu Ala Asp Tyr Pro Tyr Tyr Leu Gly Met Leu Gly Met	
235 240 245 250	
CAC GGC ACC AAA GCG GCA AAC TTC GCG GTG CAG GAG TGT GAC CTG CTG	1992
His Gly Thr Lys Ala Ala Asn Phe Ala Val Gln Glu Cys Asp Leu Leu	
255 260 265	
ATC GCC GTG GGC GCA CGT TTT GAT GAC CGG GTG ACC GGC AAA CTG AAC	2040
Ile Ala Val Gly Ala Arg Phe Asp Asp Arg Val Thr Gly Lys Leu Asn	
270 275 280	
ACC TTC GCG CCA CAC GCC AGT GTT ATC CAT ATG GAT ATC GAC CCG GCA	2088
Thr Phe Ala Pro His Ala Ser Val Ile His Met Asp Ile Asp Pro Ala	
285 290 295	
GAA ATG AAC AAG CTG CGT CAG GCA CAT GTG GCA TTA CAA GGT GAT TTA	2136
Glu Met Asn Lys Leu Arg Gln Ala His Val Ala Leu Gln Gly Asp Leu	
300 305 310	
AAT GCT CTG TTA CCA GCA TTA CAG CAG CCG TTA AAT CAA TGT GAC TGG	2184
Asn Ala Leu Leu Pro Ala Leu Gln Gln Pro Leu Asn Gln Cys Asp Trp	
315 320 325 330	
CAG CAA CAC TGC GCG CAG CTG CGT GAT GAA CAT TCC TGG CGT TAC GAC	2232
Gln Gln His Cys Ala Gln Leu Arg Asp Glu His Ser Trp Arg Tyr Asp	
335 340 345	

CAT CCC GGT GAC GCT ATC TAC GCG CCG TTG TTG TTA AAA CAA CTG TCG	2280
His Pro Gly Asp Ala Ile Tyr Ala Pro Leu Leu Leu Lys Gln Leu Ser	
350 355 360	
GAT CGT AAA CCT GCG GAT TGC GTC GTG ACC ACA GAT GTG GGG CAG CAC	2328
Asp Arg Lys Pro Ala Asp Cys Val Val Thr Thr Asp Val Gly Gln His	
365 370 375	
CAG ATG TGG GCT GCG CAG CAC ATC GCC CAC ACT CGC CCG GAA AAT TTC	2376
Gln Met Trp Ala Ala Gln His Ile Ala His Thr Arg Pro Glu Asn Phe	
380 385 390	
ATC ACC TCC AGC GGT TTA GGT ACC ATG GGT TTT GGT TTA CCG GCG GCG	2424
Ile Thr Ser Ser Gly Leu Gly Thr Met Gly Phe Gly Leu Pro Ala Ala	
395 400 405 410	
GTT GGC GCA CAA GTC GCG CGA CCG AAC GAT ACC GTT GTC TGT ATC TCC	2472
Val Gly Ala Gln Val Ala Arg Pro Asn Asp Thr Val Val Cys Ile Ser	
415 420 425	
GGT GAC GGC TCT TTC ATG ATG AAT GTG CAA GAG CTG GGC ACC GTA AAA	2520
Gly Asp Gly Ser Phe Met Met Asn Val Gln Glu Leu Gly Thr Val Lys	
430 435 440	
CGC AAG CAG TTA CCG TTG AAA ATC GTC TTA CTC GAT AAC CAA CGG TTA	2568
Arg Lys Gln Leu Pro Leu Lys Ile Val Leu Leu Asp Asn Gln Arg Leu	
445 450 455	
GGG ATG GTT CGA CAA TGG CAG CAA CTG TTT TTT CAG GAA CGA TAC AGC	2616
Gly Met Val Arg Gln Trp Gln Gln Leu Phe Phe Gln Glu Arg Tyr Ser	
460 465 470	
GAA ACC ACC CTT ACT GAT AAC CCC GAT TTC CTC ATG TTA GCC AGC GCC	2664
Glu Thr Thr Leu Thr Asp Asn Pro Asp Phe Leu Met Leu Ala Ser Ala	
475 480 485 490	
TTC GGC ATC CAT GGC CAA CAC ATC ACC CGG AAA GAC CAG GTT GAA GCG	2712
Phe Gly Ile His Gly Gln His Ile Thr Arg Lys Asp Gln Val Glu Ala	
495 500 505	

GCA CTC GAC ACC ATG CTG AAC AGT GAT GGG CCA TAC CTG CTT CAT GTC	2760
Ala Leu Asp Thr Met Leu Asn Ser Asp Gly Pro Tyr Leu Leu His Val	
510 515 520	
TCA ATC GAC GAA CTT GAG AAC GTC TGG CCG CTG GTG CCG CCT GGC GCC	2808
Ser Ile Asp Glu Leu Glu Asn Val Trp Pro Leu Val Pro Pro Gly Ala	
525 530 535	
AGT AAT TCA GAA ATG TTG GAG AAA TTA TCA TGA	2841
Ser Asn Ser Glu Met Leu Glu Lys Leu Ser	
540 545	

(2) 配列番号 2 の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 548 amino acids

(B) 配列の型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: タンパク質

(xi) 配列: SEQ ID NO:2:

Met Asn Gly Ala Gln Trp Val Val His Ala Leu Arg Ala Gln Gly Val	
1 5 10 15	
Asn Thr Val Phe Gly Tyr Pro Gly Gly Ala Ile Met Pro Val Tyr Asp	
20 25 30	
Ala Leu Tyr Asp Gly Gly Val Glu His Leu Leu Cys Arg His Glu Gln	
35 40 45	
Gly Ala Ala Met Ala Ala Ile Gly Tyr Ala Arg Ala Thr Gly Lys Thr	
50 55 60	
Gly Val Cys Ile Ala Thr Ser Gly Pro Gly Ala Thr Asn Leu Ile Thr	
65 70 75 80	
Gly Leu Ala Asp Ala Leu Leu Asp Ser Ile Pro Val Val Ala Ile Thr	
85 90 95	

Gly Gln Val Ser Ala Pro Phe Ile Gly Thr Asp Ala Phe Gln Glu Val			
100	105	110	
Asp Val Leu Gly Leu Ser Leu Ala Cys Thr Lys His Ser Phe Leu Val			
115	120	125	
Gln Ser Leu Glu Glu Leu Pro Arg Ile Met Ala Glu Ala Phe Asp Val			
130	135	140	
Ala Cys Ser Gly Arg Pro Gly Pro Val Leu Val Asp Ile Pro Lys Asp			
145	150	155	160
Ile Gln Leu Ala Ser Gly Asp Leu Glu Pro Trp Phe Thr Thr Val Glu			
165	170	175	
Asn Glu Val Thr Phe Pro His Ala Glu Val Glu Gln Ala Arg Gln Met			
180	185	190	
Leu Ala Lys Ala Gln Lys Pro Met Leu Tyr Val Gly Gly Gly Val Gly			
195	200	205	
Met Ala Gln Ala Val Pro Ala Leu Arg Glu Phe Leu Ala Ala Thr Lys			
210	215	220	
Met Pro Ala Thr Cys Thr Leu Lys Gly Leu Gly Ala Val Glu Ala Asp			
225	230	235	240
Tyr Pro Tyr Tyr Leu Gly Met Leu Gly Met His Gly Thr Lys Ala Ala			
245	250	255	
Asn Phe Ala Val Gln Glu Cys Asp Leu Leu Ile Ala Val Gly Ala Arg			
260	265	270	
Phe Asp Asp Arg Val Thr Gly Lys Leu Asn Thr Phe Ala Pro His Ala			
275	280	285	
Ser Val Ile His Met Asp Ile Asp Pro Ala Glu Met Asn Lys Leu Arg			
290	295	300	
Gln Ala His Val Ala Leu Gln Gly Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala			
305	310	315	320
Leu Gln Gln Pro Leu Asn Gln Cys Asp Trp Gln Gln His Cys Ala Gln			
325	330	335	

Leu Arg Asp Glu His Ser Trp Arg Tyr Asp His Pro Gly Asp Ala Ile
 340 345 350
 Tyr Ala Pro Leu Leu Leu Lys Gln Leu Ser Asp Arg Lys Pro Ala Asp
 355 360 365
 Cys Val Val Thr Thr Asp Val Gly Gln His Gln Met Trp Ala Ala Gln
 370 375 380
 His Ile Ala His Thr Arg Pro Glu Asn Phe Ile Thr Ser Ser Gly Leu
 385 390 395 400
 Gly Thr Met Gly Phe Gly Leu Pro Ala Ala Val Gly Ala Gln Val Ala
 405 410 415
 Arg Pro Asn Asp Thr Val Val Cys Ile Ser Gly Asp Gly Ser Phe Met
 420 425 430
 Met Asn Val Gln Glu Leu Gly Thr Val Lys Arg Lys Gln Leu Pro Leu
 435 440 445
 Lys Ile Val Leu Leu Asp Asn Gln Arg Leu Gly Met Val Arg Gln Trp
 450 455 460
 Gln Gln Leu Phe Phe Gln Glu Arg Tyr Ser Glu Thr Thr Leu Thr Asp
 465 470 475 480
 Asn Pro Asp Phe Leu Met Leu Ala Ser Ala Phe Gly Ile His Gly Gln
 485 490 495
 His Ile Thr Arg Lys Asp Gln Val Glu Ala Ala Leu Asp Thr Met Leu
 500 505 510
 Asn Ser Asp Gly Pro Tyr Leu Leu His Val Ser Ile Asp Glu Leu Glu
 515 520 525
 Asn Val Trp Pro Leu Val Pro Pro Gly Ala Ser Asn Ser Glu Met Leu
 530 535 540
 Glu Lys Leu Ser
 545

(2) 配列番号 3 の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 22 base pairs

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

(iii) ハイポセティカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(xi) 配列: SEQ ID NO:3:

TAACATCACT GAGATCATGT TG

22

(2) 配列番号 4 の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 21 base pairs

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

(iii) ハイポセティカル: NO

(iv) アンチセンス: YES

(xi) 配列: SEQ ID NO:4:

TCTTTTCTTG CATCTTGTTG G

21

(2) 配列番号 5 の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 22 base pairs

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

- 40 -

(ii) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA
(iii) ハイボセティカル: NO
(iv) アンチセンス: NO
(xi) 配列: SEQ ID NO:5:
TCTGTTTCTC AAGATTCAGG AC

22

(2) 配列番号 6 の配列の情報:

(i) 配列の性質:
(A) 配列の長さ: 19 base pairs
(B) 配列の型: 核酸
(C) 鎖の数: 一本鎖
(D) トポロジー: 直鎖状
(ii) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA
(iii) ハイボセティカル: NO
(iv) アンチセンス: YES
(xi) 配列: SEQ ID NO:6:
CGCCGGTAAA CAAAACCC

19

請求の範囲

1. L-バリンまたはL-ロイシン生産能を有するエシェリヒア属に属する微生物において、生育のためにリボ酸を要求することを特徴とする微生物。
2. L-バリンまたはL-ロイシン生産能を有するエシェリヒア属に属する微生物において、 H^+ -ATPaseを欠損したことを特徴とする微生物。
3. L-バリンまたはL-ロイシン生産能を有するエシェリヒア属に属する微生物において、生育のためにリボ酸を要求し、かつ、 H^+ -ATPaseを欠損したことを特徴とする微生物。
4. 制御機構が実質的に解除されたL-バリン生合成系遺伝子を保持することによりL-バリン生産能を有する請求項1～3のいずれか一項に記載の微生物。
5. 制御機構が実質的に解除されたL-ロイシン生合成系遺伝子を保持することによりL-ロイシン生産能を有する特徴とする請求項1～3のいずれか一項に記載の微生物。
6. 少なくとも i l v G、i l v M、i l v E 及び i l v D の各遺伝子を発現し、スレオニンデアミナーゼ活性を発現しない i l v G M E D A オペロンを含むDNA断片が細胞内に導入されたことによってL-バリン生産能を有することを特徴とする請求項4記載の微生物。
7. i l v G M E D A オペロンのL-バリン及び／又はL-イソロイシン及び／又はL-ロイシンによるアテニュエーションに必要な領域が除去されたことを特徴とする請求項6記載の微生物。
8. 除去されたアテニュエーションに必要な領域が、配列表配列番号1に示される配列においてヌクレオチド番号953～1160の配列を有することを特徴とする請求項7記載の微生物。
9. 微生物がエシェリヒア・コリである請求項1～8のいずれか一項に記載

の微生物。

10. 微生物が、エシェリヒア・コリ W1485atpA401/pMWdAR6、エシェリヒア・コリ W1485lip2/pMWdAR6又はエシェリヒア・コリAJ12631/pMWdAR6のいずれかである請求項9記載の微生物。

11. 請求項1～4、6～9のいずれか一項に記載のL-バリン生産能を有する微生物を液体培地に培養し、培養液中にL-バリンを生成蓄積せしめ、これを採取することを特徴とするL-バリンの製造法。

12. 請求項1～3、5、9のいずれか一項に記載のL-ロイシン生産能を有する微生物を液体培地に培養し、培養液中にL-ロイシンを生成蓄積せしめ、これを採取することを特徴とするL-ロイシンの製造法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP95/01719

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C12N1/21, C12N1/20, C12P13/08, C12P13/06// (C12N1/21, C12R1:19), (C12P13/08, C12P1:19)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C12N1/00-3/00, C12P13/00-13/24

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS PREVIEWS, WPI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 5-137568, A (Ajinomoto Co., Inc.), June 1, 1993 (01. 06. 93) (Family: none)	1 - 3
A		4 - 12
X	HERBERT A A et al. "Lipoic-acid Content of Escherichia-coli and Other Microorganisms", Arch. Microbiol., (1975 (RECD.1976) Vol. 106, No. 3, p. 259-266	1, 3
A		2, 4-12
P, X	YOKOTA A, et al. "Pyrubic acid production by an F-1-ATPase-defective mutant of Escherichia coli W1485lip2", Bioscience Biotechnology and Biochemistry, (1994. Dec) Vol. 58, No. 12, p. 2164-2167	1, 3
P, A		2, 4-12
P, X	YOKOTA A, et al. "Pyrubic acid production by a lipoic acid auxotroph of Escherichia coli W1485", Applied Microbiol. Biotech., (1994) Vol. 41, No. 6, p. 638-643	1, 3

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
November 21, 1995 (21. 11. 95)

Date of mailing of the international search report
December 19, 1995 (19. 12. 95)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP95/01719

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A		2, 4-12
A	Hiroshi Aida and four others "Amino Acid Fermentation" May 30, 1986 (30. 05. 86) Gakkai Shuppan Center, p. 397-422	1 - 12
A	JP, 4-330275, A (Ajinomoto Co., Inc.), November 18, 1992 (18. 11. 92) (Family: none)	1 - 12
A	JP, 61-185195, A (Mitsui Toatsu Chemicals, Inc.), August 18, 1986 (18. 08. 86) (Family: none)	1 - 12
A	EP, 519113, A1 (Ajinomoto K.K.), December 23, 1992 (23. 12. 92) (Family: none)	1 - 12
A	WO, 8702984, A (Amer. Biogenetics Co.), May 21, 1987 (21. 05. 87) & AU, 8767372, A & EP, 245497, A & JP, 63501687, W	1 - 12

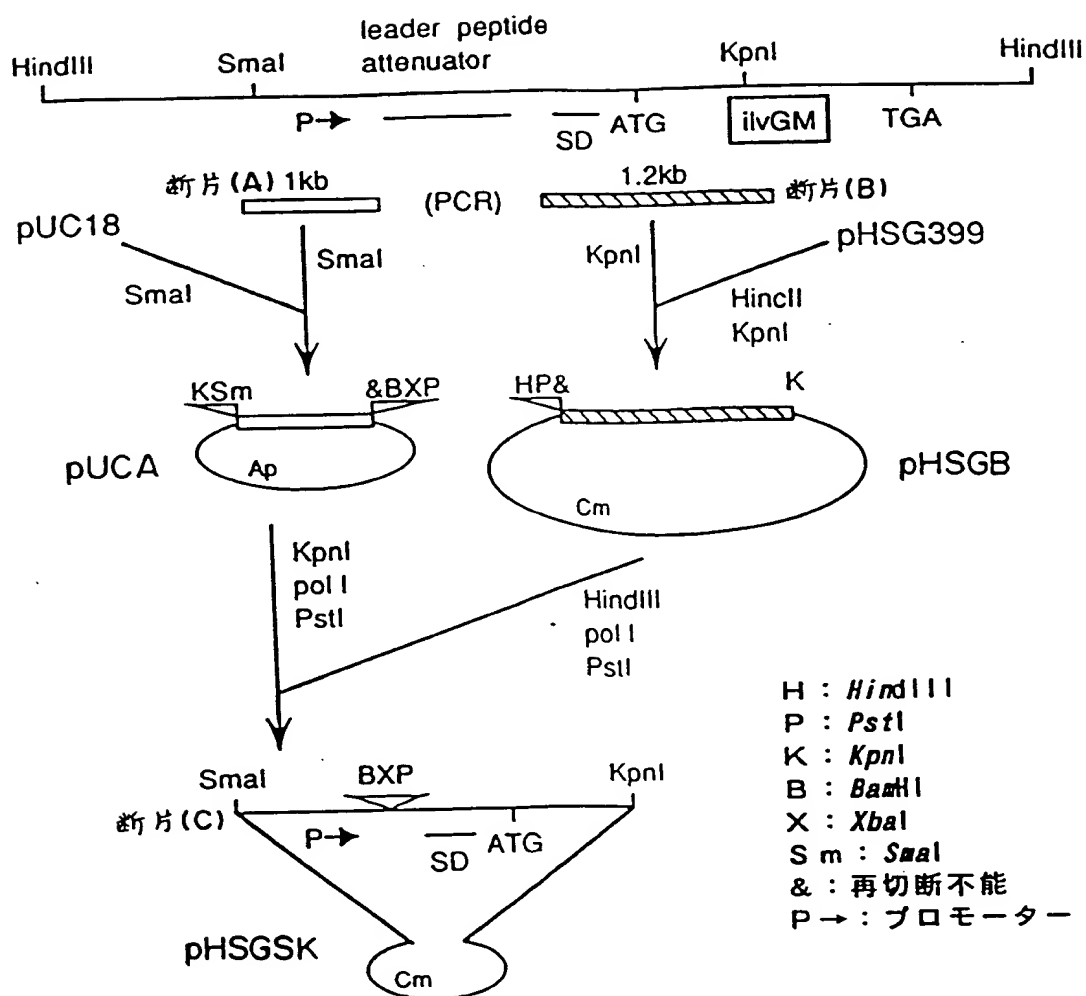
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl. ⁸ C12N1/21, C12N1/20, C12P13/08, C12P13/06/(C12N1/21, C12B1:19), (C12P13/08, C12P1:19)		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl. ⁸ C12N1/00-3/00, C12P13/00-13/24 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) BIOSIS PREVIEWS, WPI		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	JP, 5-137568, A (味の素株式会社). 1. 6月 1993 (01. 06. 93) (ファミリーなし)	1-3 4-12
X A	HERBERT A A et al. "Lipoic-acid Content of Escherichia-coli and Other Microorganisms", Arch Microbiol., (1975 (RECD.1976) 第106巻, 第3号, p. 259-266	1, 3 2, 4-12
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日 若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日 の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と 矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のため に引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規 性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文 献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性 がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 21. 11. 95		国際調査報告の発送日 19.12.95
名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 大久保 元 浩 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き). 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P. X	YOKOTA A. et al. "Pyruvic acid production by an F-1-ATPase-defective mutant of Escherichia coli W1485lip2", Bioscience Biotechnology and Biochemistry, (1994. Dec)第58巻, 第12号, p. 2164-2167	1, 3
P. A		2, 4-12
P. X	YOKOTA A. et al. "Pyruvic acid production by a lipoic acid auxotroph of Escherichia coli W1485", Applied Microbiol. Biotech., (1994)第41巻, 第6号, p. 638-643	1, 3
P. A		2, 4-12
A	相田浩 他4名編「アミノ酸発酵」 30. 5月 1986(30. 05. 86)学会出版センター p. 397-422	1-12
A	JP, 4-330275, A(味の素株式会社). 18. 11月 1992(18. 11. 92)(ファミリーなし)	1-12
A	JP, 61-185195, A(三井東圧化学株式会社). 18. 8月 1986(18. 08. 86)(ファミリーなし)	1-12
A	EP, 519113, A1(Ajinomoto K. K.) 23. 12月 1992(23. 12. 92)(ファミリーなし)	1-12
A	WO, 8702984, A(Amer. Biogenetics Co.). 21. 5月 1987(21. 05. 87) &AU, 8767372, A &EP, 245497, A &JP, 63501687, W	1-12

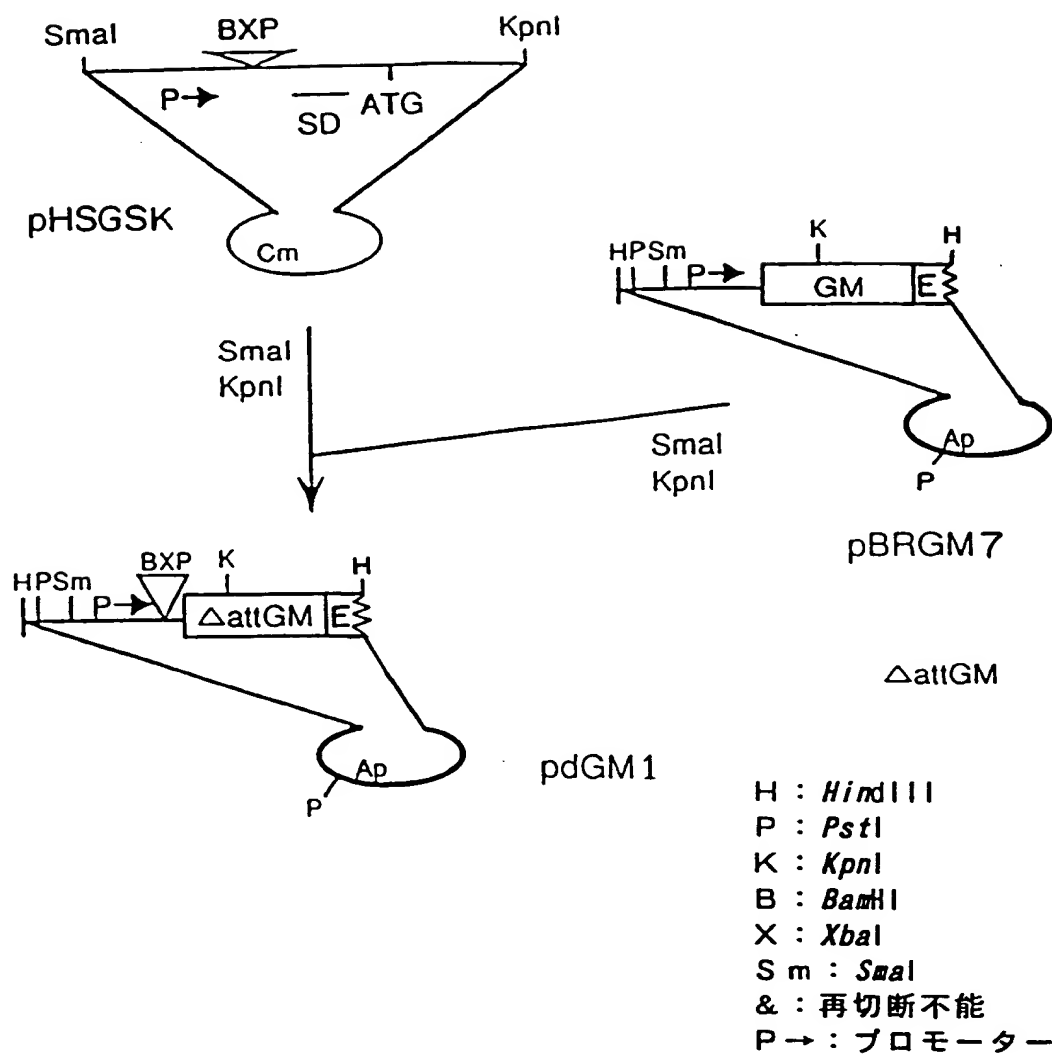
1/5

FIG. 1



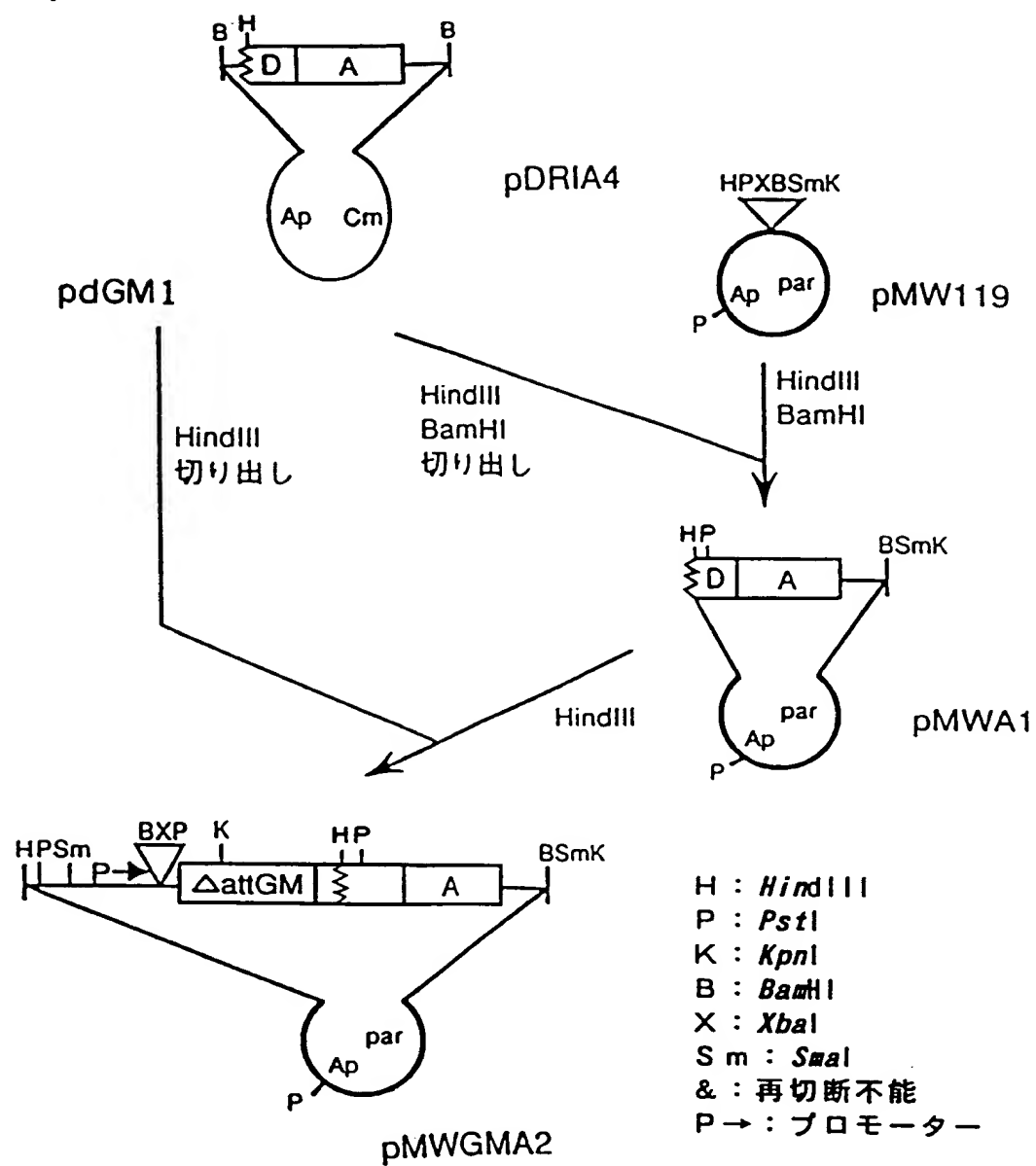
2/5

FIG. 2



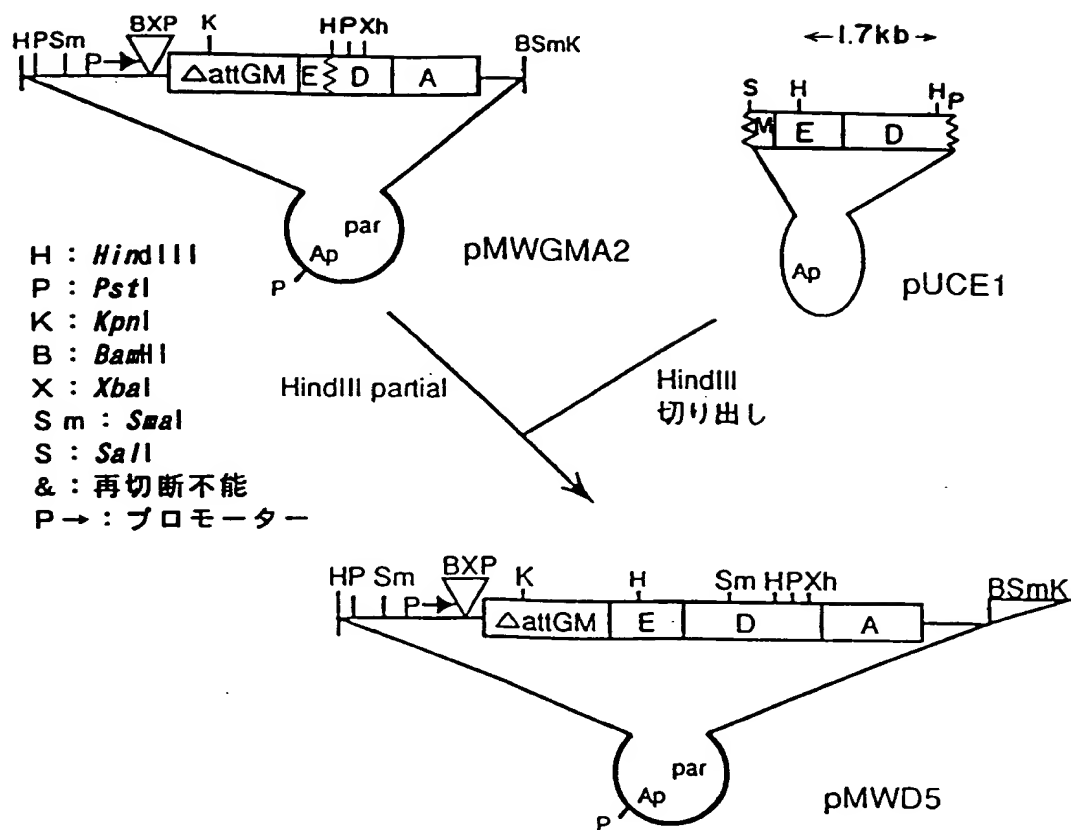
3/5

FIG. 3



4/5

FIG. 4



5 / 5

FIG. 5

